JOÃO PAULO LIMONGI FRANÇA GUILHERME

**Efeitos de derivados do composto arylpyrazole
(modulador seletivo do receptor de glicocorticóide)
sobre a atrofia muscular esquelética**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

JOÃO PAULO LIMONGI FRANÇA GUILHERME

**Efeitos de derivados do composto arylpyrazole
(modulador seletivo do receptor de glicocorticóide)
sobre a atrofia muscular esquelética**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Guilherme, João Paulo Limongi França.

Efeitos de derivados do composto arylpyrazole (modulador seletivo do receptor de glicocorticóide) sobre a atrofia muscular esquelética / João Paulo Limongi França Guilherme. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Plasticidade muscular.

Versão do título para o inglês: *In vivo* effects of two novel arylpyrazole glucocorticoid receptor modulators on skeletal muscle structure and function.

1. Músculo esquelético 2. Atrofia muscular 3. Hormônios glicocorticóides
I. Moriscot, Prof. Dr. Anselmo Sigari II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0121/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): João Paulo Limongi França Guilherme.

Título da Dissertação: Efeitos de derivados do composto arylpyrazole (modulador seletivo do receptor de glicocorticóide) sobre a atrofia muscular esquelética.

Orientador(a): Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Líneu Postes, 3415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cepi@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **123** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Anselmo Sigari Moriscot, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeitos de derivados do composto Arylpyrazole (modulador seletivo do receptor de glicocorticoide) sobre a atrofia muscular esquelética** do qual participam o(s) alunos **João Paulo Limongi França Guilherme**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **02.12.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 06 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL-MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu pai João Batista (*in memoriam*) e a minha mãe Maria Margarida, por tudo o que sou, o que tenho e o que já fiz até hoje. Exemplos de seres humanos, cristãos que formaram a mim e a meus irmãos para a vida, nos passando os mais belos e preciosos valores, raros nos dias atuais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dirigir, apoiar-me e proteger-me, mesmo quando eu não percebo. Se hoje cheguei até aqui foi porque Deus me conduziu.

A meu pai, meu maior incentivador e um grande exemplo.

A minha mãe, por me compreender e me apoiar, até quando ninguém entendia o que eu fazia. Minha mãe sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos e soube me incentivar, quando necessário. Só eu sei o que eu passei até hoje, mas minha mãe também sabe.

Ao meu avô José Limongi, pois sem a sua ajuda essa jornada teria sido bem diferente - muito obrigado, meu avô. Serei eternamente grato a esta pessoa, que tem uma humildade que só os grandes têm.

A minha avó Margarida, as minhas tias e madrinhas Maria Vilma e Maria Rute e a minha tia Maria Ligia pelas “muitas” orações para que tudo ocorresse bem e que as portas se abrissem, segundo a vontade de Deus e também pela torcida.

Aos meus irmãos José Eduardo e Luis Fernando e minhas cunhadas, sobrinho e sobrinhas. Assim como meus primos Pedro, Ricardo e todo o time de nossa família.

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot por abrir a porta de seu laboratório, confiando-me a realização deste projeto, estando continuamente presente, ensinando e ajudando no desenvolvimento deste estudo e da minha pós-graduação.

Aos colaboradores deste trabalho e colegas de laboratório: Igor Luchini Baptista, Guilherme Gianini Artioli, Andrei Rozanski, Gracielle Ramos e William Jose Da Silva. Assim como, todos aqueles que passaram pelo laboratório, neste período do meu mestrado e, por aqueles que estão chegando agora e assistiram, pacientemente, a fase final de preparação do meu mestrado: Andrea, Valéria e João Silvestre.

A Professora Dra. Elen Miyabara por ceder o seu laboratório e os equipamentos para a realização dos testes de função muscular.

Ao pesquisador Thomas S. Scanlan da Oregon Health and Science University (Portland, USA) por nos fornecer os compostos L5 e L7 utilizados neste estudo.

Aos professores integrantes da minha banca de qualificação: Profa. Dra. Alison Colquhoun, Prof. Dr. Fábio Siviero e Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes.

A Celiana Marchiori, secretária de pós-graduação de nosso departamento, por sua disponibilidade e competência, na resolução das questões referentes à pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo 10/17272-5), pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários da biblioteca do ICB-USP, pela prontidão e disposição a ajudar. Pela forma como mantêm e organizam a nossa biblioteca, permitindo um ambiente sempre agradável e proveitoso de estudo. Pela importante ajuda para a conclusão da confecção deste trabalho.

A todos os professores que tive em minha vida que de alguma forma me passaram ensinamentos importantes e me inspiraram a seguir na vida acadêmica.

E, a todos que de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho e que, por um descuido de minha parte, esqueci-me de mencionar.

RESUMO

GUILHERME, J. P. L. F. **Efeitos de derivados do composto arylpyrazole (modulador seletivo do receptor de glicocorticóide) sobre a atrofia muscular esquelética.** 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Embora ligantes bem estabelecidos para o receptor de glicocorticóide tenham sido utilizados com sucesso em várias doenças, seus efeitos colaterais são ainda um grande inconveniente, afetando uma variedade de tecidos, tais como: osso, pele, sistema nervoso central e músculo esquelético. Portanto, a concepção de novos moduladores seletivos do receptor de glicocorticóide capazes de manter os efeitos terapêuticos, porém ao mesmo tempo capazes de minimizar os efeitos colaterais é importante para uma melhor terapia. Neste estudo, testamos dois novos moduladores seletivos do receptor de glicocorticóide, nomeados L5 e L7, em comparação com o dexametasona, sobre aspectos estruturais, funcionais e moleculares no músculo esquelético. Ratos Wistar foram tratados com doses progressivas de dexametasona ou doses equimolares de L5 e L7 em 1 ou 7 dias. O músculo sóleo foi avaliado funcionalmente, pesado e em seguida utilizado para análises histológicas e moleculares. Enquanto a massa corporal e a ingestão alimentar apresentaram atenuação após o tratamento com dexametasona em todas as doses, os tratamentos tanto de L5 como de L7 mostraram comportamento semelhante aos controles. Como já era esperado, o peso do músculo foi diminuído pela dexametasona, efeito não observado nos tratamentos com L5 e com L7. Apenas o tratamento com dexametasona causou uma diminuição na área de secção transversa dos tipos de fibra muscular analisada (Tipo I, IC/IIC e IIA). A força tetânica do músculo esquelético foi severamente diminuída pela dexametasona, enquanto que os tratamentos com L5 e com L7 também não afetaram este parâmetro. A expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 foi elevada pela dexametasona; por outro lado, L5 e L7 não elevaram a expressão destes genes. Concluímos que o L5 e o L7, em contraste com o dexametasona, preveniu o músculo esquelético da perda estrutural e funcional, bem como de alterações moleculares, nas condições experimentais utilizadas neste estudo.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Hormônios glicocorticóides. Atrofia muscular.

ABSTRACT

GUILHERME, J. P. L. F. ***In vivo* effects of two novel arylpyrazole glucocorticoid receptor modulators on skeletal muscle structure and function.** 2012. 56 p. Dissertation (Masters thesis in Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Although classical glucocorticoid receptor ligands have been successfully used in several diseases, side effects are still a drawback, affecting a myriad of tissues such as bone, skin, skeletal muscle and the central nervous system. Therefore, the design of new selective glucocorticoid receptor modulators able to emphasize both the therapeutic effects and minimize the side effects is the key to improving therapeutics. In this study, we have tested two new selective modulators named L5 and L7 along with dexamethasone in skeletal muscle structural, functional and molecular aspects. Male Wistar rats were treated with progressive doses of dexamethasone and also equimolar doses of L5 and L7 for 1 and 7 days. Soleus muscle was functionally evaluated and also used for histological and molecular analysis. While body weight and food intake were decreased by the dexamethasone treatment in all doses, both L5 and L7 treatments induced gain in body weight similarly to controls. As expected, muscle weight was decreased by dexamethasone, while L5 and L7 were ineffective. Only the dexamethasone treatment caused a decrease in the analyzed cross sectional area of the skeletal muscle fiber types (Type I, IC/IIC and IIA). Skeletal muscle tetanic force was severely decreased by the dexamethasone treatment, while the L5 and L7 treatments did not alter this parameter. MAFbx/Atrogin-1 and MuRF-1 gene expressions were highly elevated by dexamethasone; on the other hand, L5 and L7 did not modulate any expression of those genes. We conclude that L5 and L7, in the experimental conditions used in this study, in contrast to dexamethasone, spare skeletal muscle from structural and functional loss, and molecular alterations, reinforcing their role as a therapeutic device.

Key words: Skeletal muscle. . Glucocorticoid hormones. Muscle atrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides na célula.	17
Figura 2 – Visão geral da estrutura do receptor de glicocorticóide.	18
Figura 3 – Mecanismo de proteólise pelo sistema ubiquitina-proteassoma (UPS).	25
Figura 4 – Comportamento da ingestão alimentar durante o tratamento com dexametasona (dexa) L5 e L7.	37
Figura 5 – Comportamento da massa corporal durante o tratamento com dexametasona (A), L5 (B) e L7 (C).	38
Figura 6 - Fotomicrografia de duas lâminas histológicas coradas pela reação histoquímica para ATPase miosínica pré-incubadas em diferentes pHs.	41
Figura 7 – Fotomicrografia mostrando um campo visual de um animal por grupo (pH 4.3).	42
Figura 8 – Força tetânica (gramas) relativa ao comprimento naso-caudal (cm) no músculo sóleo de animais tratados na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).	43
Figura 9 – Expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1.	44
Figura 10 – Expressão gênica de MuRF-1.	45
Figura 11 – Expressão gênica de Trim32.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de meia-vida, afinidade ao receptor e potência de medicamentos glicocorticóides.....	16
Tabela 2 - Efeitos colaterais avaliados em compostos moduladores seletivos do RG, não esteróides, estudados por meio de modelos <i>in vivo</i>	22
Tabela 3 – Doses utilizadas em cada medicamento de acordo com o peso molecular.....	32
Tabela 4 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados na análise da expressão gênica.....	35
Tabela 5 – Pesos absoluto e relativo ao comprimento naso-caudal (CNC) da glândula adrenal e do baço após 7 dias de tratamentos na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).	39
Tabela 6 – Peso absoluto e relativo ao comprimento naso-caudal do músculo sóleo e a proporção do peso muscular seco em relação ao peso úmido.	40
Tabela 7 – Área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares presentes no músculo sóleo após 7 dias de tratamento na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).	42

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIACÕES

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

AF-1 – função de ativação 1

AF-2 - função de ativação 2

AP-1 - proteína de ativação 1 do complexo dos fatores de transcrição

AST – área de secção transversa

cDNA – DNA complementar

CNC – comprimento naso-caudal

Dexa – dexametasona

G6Pase - glicose-6-fosfatase

GC - glicocorticóide

GRE - *glucocorticoid responsive element*

HPA - hipotálamo-pituitária-adrenal

HSP - *heat shock proteins*

MAFbx – *muscle atrophy F-box*

mRNA – RNA mensageiro

MuRF-1 - *muscle RING-finger 1*

NFkB - fator nuclear Kappa-B

PAM – pressão arterial média

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxilase

POMC - proopiomelanocortina

RG – Receptor de Glicocorticóide

Ub – ubiquitina

UPS - *ubiquitin-proteasome system* (sistema ubiquitina-proteassoma)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hormônios: glicocorticóides	14
1.2 Aplicação clínica do glicocorticóide	15
1.3 Mecanismos de ação dos glicocorticóides	16
1.4 Efeitos colaterais do uso crônico de glicocorticóides	19
1.5 Desenvolvimento de novos fármacos com perfil de dissociação	20
1.6 Compostos utilizados como moduladores seletivos	21
1.7 Atrofia muscular esquelética	23
1.8 Atrofia muscular esquelética induzida por glicocorticóides	26
1.9 Propriedades contráteis no músculo atrofiado por glicocorticóides	28
1.10 Aspecto clínico da atrofia do músculo esquelético	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Aspectos éticos	31
3.2 Delineamento experimental	31
3.3 Análise do consumo alimentar	32
3.4 Teste de função muscular	33
3.5 Histologia e histoquímica para a ATPase miosínica	33
3.6 Extração do mRNA e reação de transcrição reversa	34
3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	35
3.8 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Efeito dos tratamentos sobre a ingestão alimentar e a massa corporal	37
4.2 Efeito dos tratamentos sobre a massa da glândula adrenal e do baço	39
4.3 Efeito dos tratamentos sobre a massa muscular	39
4.4 Efeito dos tratamentos sobre a área de secção transversa (AST) em diferentes tipos de fibra muscular existentes no sóleo	40
4.5 Efeito dos tratamentos sobre a função muscular	43
4.6 Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica	43
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios: glicocorticóides

Em um organismo pluricelular nenhuma de suas células vive isolada. Uma complexa rede de comunicações entre os diversos tipos celulares coordena e mantém o correto funcionamento dos tecidos e órgãos (BIANCO; RABELO, 1999). Existem dois principais sistemas de comunicação celular existentes no organismo: o nervoso e o endócrino (WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2006). Em um grupo de células, a comunicação é estabelecida por contato direto entre células até a informação atingir a célula-alvo (comunicação via células neurais). No entanto, algumas células necessitam comunicar-se através de distâncias maiores, no qual não existe contato direto célula-célula (BIANCO; RABELO, 1999). Neste caso, células endócrinas são sensíveis a alterações (estímulos) e respondem secretando substâncias químicas (hormônios) liberadas na corrente sanguínea. Estas substâncias são conduzidas pela circulação sanguínea a diversos tecidos, onde sinalizam e atuam sobre as células-alvo, desencadeando respostas biológicas (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006), tais como: o controle da velocidade das diferentes reações químicas, o transporte de substâncias através das membranas celulares, o controle do crescimento e secreção celular, entre outros aspectos do metabolismo celular (GUYTON; HALL, 2006).

Localizadas retroperitealmente nos pólos superiores de ambos os rins, encontram-se as glândulas adrenais ou supra-renais (MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999). Cortando-se a glândula a fresco, nota-se que ela é dividida em duas camadas: uma periférica, de cor amarelada, denominada camada cortical ou córtex adrenal, e outra central, acinzentada, a camada medular ou medula adrenal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). A medula adrenal está funcionalmente relacionada com o sistema nervoso, secretando os hormônios adrenalina e noradrenalina. Já o córtex supra-renal secreta um grupo de hormônios denominados corticosteróides (GUYTON; HALL, 2006).

As células do sistema endócrino liberam mais de 100 hormônios e substâncias hormonalmente ativadas, que do ponto de vista químico, podem ser divididas em três classes: esteróides, pequenos peptídeos (polipeptídeos) e proteínas derivadas do ácido araquidônico (ROSS; PAWLINA, 2008). Os corticosteróides são exemplos de hormônios esteróides (estrutura química semelhante à do colesterol ou derivados do colesterol) (GUYTON; HALL, 2006). Os corticosteróides podem ser divididos em três subtipos, de acordo com suas funções

fisiológicas: mineralcorticóides, glicocorticóides ou androgênios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011), sendo os dois primeiros os principais hormônios deste grupo; os hormônios androgênicos são secretados em quantidades pequenas em comparação com os outros dois (GUYTON; HALL, 2006).

Os glicocorticóides são assim chamados devido ao seu importante efeito sobre o metabolismo glicêmico, tendo como principal representante o hormônio cortisol (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006). O cortisol aumenta a taxa de gliconeogênese pelo fígado (formação de carboidratos a partir de proteínas ou lipídios), reduzindo as reservas proteicas de praticamente todas as células corporais, à exceção das células hepáticas e também aumentando a mobilização de ácidos graxos das células adiposas, dessa forma, ocorre uma maior disponibilidade de substratos para a produção de energia (GUYTON; HALL, 2006).

A liberação de glicocorticóides pelo córtex adrenal é estimulada pela secreção adeno-hipofisária do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (KYROU; TSIGOS, 2009). Uma ampla variedade de estímulos não específicos, quase que qualquer tipo de *stress* sobre o organismo, seja ele físico ou neurogênico, provoca uma elevação imediata de ACTH e seguida dentro de poucos minutos, de aumento pronunciado da secreção de cortisol (GUYTON; HALL, 2006).

1.2 Aplicação clínica do glicocorticóide

Além dos efeitos sobre o metabolismo energético, os glicocorticóides, sobretudo o cortisol, apresenta ação anti-inflamatória e imunossupressora. No final da década de 40, devido à escassez de medicamentos para tal fim, Philip Hench e seus colaboradores, procurando atender a pacientes que sofriam de artrite reumatóide, realizaram um estudo e descobriram que a cortisona (glicocorticóide sintético semelhante ao cortisol) possuía um efeito bloqueador importante sobre a inflamação (KIRWAN; BALINT; SZEBENYI, 1999). Pouco mais de um ano depois, a cortisona já havia sido licenciado pela *United States Food and Drug Administration* e muitos pacientes que sofriam de artrite reumatóide ao redor do mundo já estavam sendo tratados com cortisona (CLARK, 2007). Esta descoberta foi tão fascinante para a ciência que Philip Showalter Hench, Edward Calvin Kendall e Tadeus Reichstein receberam o Prêmio Nobel para fisiologia e medicina em 1950 pelas suas descobertas sobre a estrutura do cortisol e seus efeitos biológicos (HENCH, 1950).

O cortisol exerce dois efeitos antiinflamatórios básicos: bloqueia os estágios iniciais do processo inflamatório; e com a inflamação já presente, causa a rápida resolução do processo, aumentando a velocidade de cicatrização. Além disso, o cortisol apresenta potente efeito imunossupressor, sendo muito útil na prevenção da rejeição imunológica de transplantes de coração, rim e outros órgãos (GUYTON; HALL, 2006).

Para otimizar a utilização do glicocorticóide como medicamento, durante a década de 1950, foram realizadas modificações na estrutura do hormônio, resultando no desenvolvimento de novos fármacos, semelhantes ao cortisol, porém com diferentes: potências, durações, afinidades e tempo de ligação ao receptor (LONGUI, 2007).

Estes novos medicamentos são classificados de acordo com a meia-vida plasmática, afinidade ao receptor e por sua potência (Tabela 1). A potência do fármaco é avaliada pela sua afinidade ao receptor e pela duração de sua ação (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008). Atualmente, os glicocorticóides sintéticos são as drogas mais prescritas na medicina, sendo utilizados em praticamente todas as especialidades médicas (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002). São exemplos de doenças tratadas com estes medicamentos: artrite, psoríase, asma, esclerose múltipla, alergias, distúrbios gastrointestinais, doenças vasculares, transplantes, entre outras (DE BOSSCHER, 2010).

Tabela 1 – Características de meia-vida, afinidade ao receptor e potência de medicamentos glicocorticóides.

Glicocorticóide	½ vida plasmática (h)	Afinidade ao receptor	Potência glicocorticóide	Dose equivalente (mg)
Cortisol	2,0	100	1	20
Prednisolona	3,2	220	4	5
Metilprednisolona	2,5	1.190	5	4
Dexametasona	4,0	710	25-30	0,75

FONTE: Modificado de LONGUI (2007).

1.3 Mecanismos de ação dos glicocorticóides

Os glicocorticóides penetram facilmente nas células por causa de sua natureza lipofílica (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010). Suas principais ações ocorrem após a interação do hormônio (ou um ligante sintético) com o seu receptor, que é

específico, neste caso o receptor de glicocorticóide (RG) (DE BOSSCHER, 2010). O RG pertence à família dos receptores nucleares, atuantes como fatores de transcrição dependentes do ligante (VAN DER LAAN; MEIJER, 2008). A ligação do ligante ao receptor provoca uma alteração conformacional nas proteínas do receptor, permitindo que este complexo formado pelo ligante e pelo receptor interaja com co-fatores e ao elemento responsivo ao glicocorticóide (*glucocorticoid responsive element* - GRE), que são sequências específicas no DNA, contendo as regiões promotoras dos genes alvo (ZHANG et al., 2004).

Existem duas isoformas do RG (alfa e beta). Ambas as isoformas são estruturalmente bem semelhantes (94% idênticas), no entanto a isoforma beta é incapaz de ligar-se aos glicocorticóides e de ativar a transcrição gênica, portanto representa uma forma inativa do receptor (FARIA; LONGUI, 2006).

Na ausência do ligante, o RG encontra-se inativo no citoplasma, estabilizado por um complexo protéico, as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP). As HSP evitam que o receptor exerça qualquer efeito sobre o DNA na ausência do ligante e também permitem que o receptor se apresente em uma forma tridimensional adequada para a sua ligação ao hormônio (BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 1998).

Como é mostrado na figura 1, após os glicocorticóides entrarem no citoplasma, o receptor se dissocia das HSP, interagindo com o glicocorticóide, formando o complexo ligante/receptor. Este complexo se transloca para o núcleo celular, onde interage com o GRE, bem como a fatores de transcrição, modulando a transcrição gênica (BARRA et al., 2004; FARIA; LONGUI, 2006).

Figura 1 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides na célula.

FONTE: Adaptado de LONGUI (2007).

Os receptores nucleares possuem três domínios (figura 2): localizado na extremidade amino-terminal encontra-se o domínio de ativação gênica; na região central encontra-se o domínio de ligação ao DNA; na extremidade carboxi-terminal encontra-se o domínio de ligação ao ligante (FARIA; LONGUI, 2006).

Figura 2 – Visão geral da estrutura do receptor de glicocorticóide.

FONTE: Adaptado de FARIA e LONGUI (2006).

A extremidade amino-terminal contém uma região transcricional denominada função de ativação 1 (AF-1) (KUMAR; THOMPSON, 2005). Após a translocação do complexo ligante/receptor para o núcleo, esta região (AF-1) funciona como uma plataforma de ancoragem para proteínas de remodelação da cromatina (co-ativadores), contribuindo na atividade transcricional (WARNMARK et al., 2003). A porção carboxi-terminal apresenta a região de ativação de função 2 (AF-2). Uma atividade transcricional ótima requer uma ação combinada entre estas duas regiões (AF-1 e AF-2) (WARNMARK et al., 2003).

O domínio de ligação ao ligante localizado na região carboxi-terminal apresenta algumas funções essenciais, com destaque a capacidade desta região de reconhecer e se ligar as HSP (na ausência do ligante) e na presença do ligante interagir com este formando o complexo ligante/receptor (KUMAR; THOMPSON, 2005; VAN DER LAAN; MEIJER, 2008).

O domínio central de ligação ao DNA inclui dois subdomínios denominados dedos de zinco (*zinc fingers*) (FARIA; LONGUI, 2006). O primeiro dedo de zinco é responsável pelo reconhecimento e ligação ao GRE, já o segundo dedo de zinco estabiliza a interação da proteína ao DNA (NECELA; CIDLOWSKI, 2004).

A ligação direta do complexo ligante/receptor ao GRE, representa a principal forma de modulação positiva na expressão gênica (SCHACKE et al., 2007), induzindo a expressão, não

somente de genes que codificam proteínas antiinflamatórias, mas também genes que atuam no metabolismo sistêmico, como os genes que codificam proteínas que promovem gliconeogênese (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008), tais como: a glicose-6-fosfatase (G6Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK) (KYROU; TSIGOS, 2009; VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007).

O complexo ligante/receptor também pode interagir diretamente com fatores de transcrição, por meio de interações proteína-proteína (DE BOSSCHER; VANDEN BERGHE; HAEGEMAN, 2003; KASSEL; HERRLICH, 2007), os principais fatores de transcrição que realizam esta interação são: AP-1 (proteína de ativação 1 do complexo dos fatores de transcrição) e NFkB (fator nuclear Kappa-B) (DE BOSSCHER; VANDEN BERGHE; HAEGEMAN, 2003; NECELA; CIDLOWSKI, 2004).

Com a acionamento de AP-1 e NFkB, uma ampla variedade de citocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias são ativadas. Porém, quando o complexo ligante/receptor interage com AP-1 e NFkB ocorre um efeito inibitório das funções pró-inflamatória ocasionada por estes fatores de transcrição, impedindo as suas ações por inibição competitiva (KASSEL; HERRLICH, 2007). Justificando o extenso uso dos glicocorticóides sintéticos como agente anti-inflamatório (DE BOSSCHER, 2010).

1.4 Efeitos colaterais do uso crônico de glicocorticóides

Ao mesmo tempo em que os glicocorticóides sintéticos são medicamentos muito eficientes, sendo os fármacos mais prescritos na medicina, são também problemáticos, principalmente para aqueles que fazem uso prolongado. Paralelamente aos potentes efeitos antiinflamatórios, aparecem uma série de efeitos colaterais [Clark, 2007 #1].

O uso crônico destes medicamentos, leva ao aparecimento de, por exemplo: diabetes, osteoporose, glaucoma, catarata, hipertensão, dislipidemia, retardo no crescimento, distúrbios do humor, alteração na produção endógena de cortisol, atrofia cutânea e muscular, entre outros (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002).

Para permitir que o tratamento dos pacientes seja eficaz e mais seguro, existe hoje um forte apelo clínico para o desenvolvimento de drogas que apresentem características antiinflamatórias e imunossupressoras similares aos glicocorticóides sintéticos comercialmente vendidos, no entanto, que apresentem reduzidos efeitos colaterais (SCHÄCKE et al., 2007; SCHÄCKE et al., 2006).

Algumas estratégias foram elaboradas para esta finalidade. Verificaram o efeito do encapsulamento dos comprimidos de uso oral, utilizando lipossomos, dessa maneira o efeito do medicamento é potencializado, consequentemente menos glicocorticóide sintético é ingerido. Ainda, foi abordada a introdução do óxido nítrico na fórmula química do medicamento, aumentando a sua potência, sem interferir na absorção sistêmica (SCHACKE et al., 2007). Estas estratégias estão sendo exploradas, contudo, os maiores esforços vêm sendo direcionados para a confecção de medicamentos que seletivamente atuem sobre o receptor de glicocorticóide, apresentando um perfil de dissociar o efeito desejável do medicamento das consequências indesejáveis (efeitos colaterais) (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010).

1.5 Desenvolvimento de novos fármacos com perfil de dissociação

A maioria dos efeitos colaterais que aparecem após o uso crônico dos glicocorticóides sintéticos ocorrem devido a interação do complexo ligante/receptor ao GRE, modulando a expressão gênica (LOWENBERG et al., 2008). Por outro lado, a interação com fatores de transcrição, especialmente AP-1 e NFkB, por meio de interações proteína-proteína, acarretam na maior parte dos efeitos antiinflamatórios do medicamento (HERRLICH, 2001; NISSEN; YAMAMOTO, 2000).

Foi identificado que o complexo ligante/receptor pode assumir diferentes orientações ou estados conformacionais (LEFSTIN; YAMAMOTO, 1998). Sendo que, a orientação que este complexo assume determinará qual atividade (modulação gênica) ou qual tipo de ligação (direta ao GRE ou por proteína-proteína) será realizada (LEFSTIN; YAMAMOTO, 1998).

Posteriormente foi verificado que diferentes ligantes com afinidade para o RG, podem ocasionar diferentes orientações no complexo ligante/receptor, dessa forma alterando a resposta gerada pelo complexo ligante/receptor (REICHARDT et al., 2001).

Com base nestas descobertas, muitos grupos de pesquisa tem procurado elaborar compostos que seletivamente modulem o estado conformacional do RG, fazendo com que o complexo ligante/receptor apresente menor ligação direta ao GRE, reduzindo ao máximo a modulação gênica responsável por induzir os efeitos colaterais, porém mantendo as interações proteína-proteína, sustentando o efeito terapêutico do medicamento e dessa maneira dissociando os efeitos desejáveis dos efeitos colaterais, tornando a prescrição do medicamento mais segura ao paciente (DE BOSSCHER, 2010).

1.6 Compostos utilizados como moduladores seletivos

Os primeiros compostos com perfil de dissociação foram publicados e patenteados pela empresa farmacêutica francesa Sanofi-Aventis (antigamente chamada de Roussel-Uclaf) e são eles: RU 24782, RU 24858 e RU 40066 (DE BOSSCHER, 2010), todos desenvolvidos a partir de uma estrutura esteróide, agindo como antagonistas do RG e mostrando excelente dissociação *in vitro* (VAYSSIERE et al., 1997). Entretanto, este perfil interessante nas análises *in vitro* não se repetir nas análises *in vivo*, por exemplo: o RU 24858 mostrou ação anti-inflamatória semelhante ao prednisolona em um modelo de asma experimental em ratos, porém o composto apresentou os mesmos efeitos colaterais que o hormônio sintético, como: perda de peso e indução de osteoporose (BELVISI et al., 2001).

Esta não permanência do perfil de dissociação nos modelos *in vivo*, pode ter acontecido devido à estrutura esteróide do composto, deste modo a substância pode estar sendo metabolizada de forma semelhante ao prednisolona (SCHACKE et al., 2007). Esta hipótese mudou a direção de algumas pesquisas e agora novos compostos com estrutura não esteróide estão sendo desenvolvidos e avaliados. A tabela 2 mostra os principais achados em compostos moduladores seletivos do RG, não esteróides, analisados por experimentos *in vivo*.

Tabela 2 - Efeitos colaterais avaliados em compostos moduladores seletivos do RG, não esteróides, estudados por meio de modelos *in vivo*.

Composto	Efeitos colaterais avaliados
AL-438	Reduziu hiperglicemia causada por glicocorticóides Não reduziu a massa óssea
CpdA	Reduziu hiperglicemia causada por glicocorticóides Reduziu a supressão no eixo HPA causada por glicocorticóides Não causou resistência a glicocorticóides
LGD5552	Repressão na POMC (peptídeo precursor de ACTH) Não aumentou % de gordura corporal Não reduziu a massa óssea Não aumentou a PAM (na menor dose) Reduziu a perda na massa da glândula adrenal induzida pelo tratamento
ZK245186	Menor apoptose de timócitos
BI115	Nenhum efeito sobre o triglicérides

FONTE: Retirado de (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010)

Shah e Scanlan (2004) propuseram e avaliaram compostos derivados da molécula *arylpyrazole* como novos candidatos não esteroides. Neste primeiro estudo foi verificado por análise *in vitro* que as moléculas derivadas do *arylpyrazole* apresentavam interação com o RG, umas mais outras menos (SHAH; SCANLAN, 2004). Alguns anos depois estas moléculas foram aprimoradas, os pesquisadores realizaram alterações na estrutura química original do *arylpyrazole* e chegaram a 15 diferentes compostos, que foram nomeados de L1 a L15 (WANG et al., 2006).

Após verificarem por *microarray* genes responsivos ao dexametasona em células A549 (linhagem celular do tecido epitelial alveolar), os pesquisadores administraram estes compostos (L1-L15) em três linhagens celulares diferentes: A549, MC3T3-E1 (osteoblastos), 3T3-L1 (adipócitos) (WANG et al., 2006). Foi examinado a diferenciação e a resposta gênica

destas linhagens celulares após 5 dias de administração dos 15 compostos em comparação com o dexametasona. Apesar da estrutura similar entre os compostos, foi observada uma variação bastante elevada nas respostas geradas por cada composto. Alguns foram mais promissores do que outros, apresentando boa dissociação *in vitro*. Com estes resultados, o composto mais promissor foi analisado *in vivo*. Camundongos receberam doses do composto L5 e tecidos susceptíveis a efeitos colaterais foram analisados em comparação com o prednisolona (ROOHK et al., 2010).

A comparação com o prednisolona revelou aspectos positivos e negativos do L5. Dentre os aspectos positivos estão a ausência de inibição na síntese de colágeno no tecido ósseo e epitelial e ausência de interferência no metabolismo adiposo. Com relação aos aspectos negativos estão: a falta de ação imunossupressora; supressão na neurogênese no hipocampo; aumento na resistência a insulina (ROOHK et al., 2010). Contudo nem todos os tecidos foram avaliados de forma convincente.

De uma forma geral, até o momento, nenhum dos novos moduladores seletivos do RG, foi eficiente a ponto de concorrer com os ligantes sintéticos do RG já comercialmente vendidos (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010). Pesquisas que buscam encontrar o composto ideal continuam.

1.7 Atrofia muscular esquelética

O músculo esquelético é o tecido mais abundante no corpo (MATSAKAS; PATEL, 2009) e apresenta uma grande plasticidade, podendo alterar a sua massa, aumentando ou diminuindo, de acordo com o estímulo gerado ao organismo (PETTE, 2001).

Esta plasticidade muscular é mediada por um balanço entre as taxas de síntese e de degradação protéica (MCCARTHY; ESSER, 2010). Há situações em que ocorre um estímulo nos mecanismos envolvidos na síntese protéica, quando este aumento excede a taxa de degradação, os músculos aumentam sua massa (hipertrofiam) (GELFI; VASSO; CERRETELLI, 2011), como por exemplo, através da ingestão adequada de aminoácidos e carboidratos combinados com a prática regular de exercício físico (GLYNN et al., 2010). Por outro lado, os músculos perdem massa (atrofiam), quando a degradação (proteólise) predomina sobre a síntese (SAINI et al., 2009). Dessa forma, durante a atrofia muscular as reações de síntese protéica podem estar inibidas, inalteradas ou mesmo ativadas, desde que, as reações envolvidas na proteólise muscular estejam intensificadas e predominando sobre

qualquer reação de síntese (VENTADOUR; ATTAIX, 2006). Esta situação pode ocorrer durante o envelhecimento, processo chamado de sarcopenia, ou frente a muitas doenças crônicas-degenerativas, processo chamado de caquexia (LITTLE; PHILLIPS, 2009).

Do ponto de vista celular e molecular, existem vias que são responsáveis pela síntese protéica e vias que conduzem a proteólise. Como os demais tecidos do nosso organismo, os músculos esqueléticos, contêm mais do que uma via envolvida nas reações de proteólise, são elas: o sistema ubiquitina-proteassoma (*ubiquitin-proteasome system* - UPS), sistemas lisossomal e cálcio-ativado, e as caspases (VENTADOUR; ATTAIX, 2006). Evidências convincentes apontam que apesar de cada via ter a sua importância, o UPS desempenha um papel-chave, sendo considerada a principal via envolvida na degradação de proteínas intracelulares no músculo esquelético (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006; LECKER et al., 1999).

Pelo UPS ocorre uma série de reações químicas, com dispêndio energético (dependentes da hidrólise da molécula de ATP), no qual proteínas-alvo são associadas ao co-fator ubiquitina, marcando a proteína (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008). O proteassoma, que é um complexo de diversas proteases presente no citoplasma, reconhece esta marcação e degrada estas proteínas poli-ubiquitinadas a pequenos peptídeos com cerca de oito aminoácidos cada um (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Estes pequenos peptídeos liberados pelo proteassoma de volta ao citoplasma são rapidamente degradados (em questão de segundos) a aminoácidos pelas enzimas endopeptidases citosólicas e aminopeptidases (SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004).

O processo de associação das cadeias de ubiquitina as proteínas-alvo envolve a ação sequencial e coordenada de três enzimas específicas (figura 3): as E1, enzimas de ativação do processo de ubiquitinação; as E2, enzimas que preparam o co-fator ubiquitina para conjugação; e as E3, enzimas que reconhecem as proteínas-alvo e ligam as cadeias de ubiquitina a estas proteínas, por isto estas enzimas também são chamadas de E3 ligases (PASSMORE; BARFORD, 2004).

Figura 3 – Mecanismo de proteólise pelo sistema ubiquitina-proteassoma (UPS).

FONTE: adaptado de MURTON, CONSTANTIN e GREENHAFF (2008).

No final do século 20, pesquisadores procuraram identificar moléculas com potencial de serem marcadores universais da atrofia muscular, ou seja, moléculas que são regularmente expressas em diferentes modelos experimentais de atrofia no músculo esquelético (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001; LECKER et al., 2004). Com a utilização de métodos como o *microarray* (mapeamento da expressão de RNA mensageiro) e o uso de animais geneticamente modificados, foi possível observar que duas E3 ligases específicas de músculo, MAFbx (*muscle atrophy F-box*), também conhecida como Atrogin-1 e MuRF-1 (*muscle RING-finger 1*) apresentam aumentos expressivos em diferentes modelos atrofícos. Primeiramente, este resultado foi notado nos seguintes modelos atrofícos: jejum, câncer, disfunção renal, diabetes, desnervação e imobilização (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001; LECKER et al., 2004). Posteriormente, outros modelos foram testados, incluindo o uso de glicocorticóides sintéticos, confirmando a persistência no aumento destas duas E3 ligases (FOLETTA et al., 2011).

De uma forma geral, no organismo de mamíferos, somente uma enzima E1 funcional foi identificada, no entanto, existem numerosas enzimas E2 e E3 ligases (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006). Apesar desta variedade, o resultado indicado pelo *microarray*

de animais expostos a diferentes modelos atrofícos, mostra que os drásticos aumentos observados no MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 contrastam com a falta de mudanças na expressão das outras enzimas do UPS, incluindo a E1, muitas E2 e outras E3 ligases (LECKER et al., 2004).

Quando animais *knock-out* para MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 são submetidos a 14 dias de desnervação, o músculo gastrocnêmio apresenta, respectivamente, 56% e 36% de proteção contra a atrofia avaliada pelo peso absoluto do músculo (BODINE et al., 2001). Confirmando a importância destas duas enzimas para a indução da atrofia muscular esquelética.

MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 apresentam estrutura molecular diferente, incluindo sequência de aminoácidos e sítios de interação. Desta maneira, apesar de ambas agirem como E3 ligases, as proteínas-alvo destas enzimas não são as mesmas, portanto cada uma delas contribui para a proteólise muscular de uma forma distinta (FOLETTA et al., 2011).

1.8 Atrofia muscular esquelética induzida por glicocorticóides

O uso crônico de glicocorticóides sintéticos pode ocasionar no músculo esquelético: uma redução nas reações de síntese protéica (efeito anti-anabólico) ou um aumento nas reações de proteólise muscular (efeito catabólico) ou ambos os efeitos (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008). No entanto, a principal razão para o aparecimento da atrofia muscular após o uso de glicocorticóides é o aumento na proteólise (SEENE, 1994), principalmente devido a ativação do UPS (AUCLAIR et al., 1997).

A administração do dexametasona (glicocorticóide sintético mais potente), em ratos, causa uma atenuação progressiva e dose-dependente na massa corporal total e no tecido muscular do animal (MA et al., 2003). O músculo gastrocnêmio, após 5 dias de experimento, reduz por volta de 15% a sua massa muscular, de forma semelhante nas doses de 600 e 1200 µg/kg de peso corporal (não houve diferença entre as doses), porém esta queda foi significativamente maior que o valor encontrado no grupo tratado com 60 µg/kg de peso corporal (redução de aproximadamente 6%) (MA et al., 2003). Este trabalho ainda mostrou que este efeito não foi tempo-dependente, uma vez que os valores encontrados foram semelhantes ao comparar 5 e 10 dias de tratamento.

O músculo esquelético é composto por fibras musculares que apresentam estrutura e metabolismo variado, onde o metabolismo exercido por determinada fibra muscular apresenta

relação direta com a sua estrutura (PETTE; STARON, 2000). Esta diversidade advém do fato de que uma série de proteínas do aparato miofibrilar, do sistema de acoplamento contração-relaxamento e da membrana apresentam mais do que uma isoforma, combinadas de forma diferente entre os diversos músculos (PETTE, 2002). As isoformas proteicas existentes em cada fibra muscular, especialmente a isoforma da miosina de cadeia pesada, permite estabelecer uma classificação das fibras musculares.

As fibras musculares podem ser classificados em dois principais tipos: (1) fibras musculares lentas ou vermelhas, ricas em mioglobina e mitocôndria, mais especializada em atividades aeróbias (fibras tipo I) e (2) fibras musculares rápidas ou brancas, pobres em mioglobina e mitocôndria, mais específica para o desenvolvimento de força (fibras tipo IIB), contudo existem fibras intermediárias entre estes dois principais grupos, formando uma série de subtipos, como por exemplo, as fibras tipo IC, IIC ou IIA (SCHIAFFINO, 2010).

A atrofia observada no músculo esquelético é caracterizada por uma redução na área de secção transversa das fibras musculares, principalmente nas fibras rápidas ou vermelhas (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008). Apesar desta atrofia ser mais evidente nos músculos vermelhos (com maior predominância de fibras tipo IIB), como o extensor longo dos dedos ou o gastrocnêmio, músculos brancos (com maior predominância de fibras tipo I), como o sóleo, também são sensíveis ao uso de glicocorticóides (doses acima de 600 µg/kg de peso corporal) e apresentam uma queda significativa em sua massa após um período prolongado de tratamento (JONES et al., 2010).

Devido ao expressivo aumento de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 em diferentes modelos atroficos, pesquisadores utilizam a expressão gênica destas duas enzimas como marcadores de proteólise muscular. Neste sentido, entre três e dezesseis horas após a administração de dexametasona, em doses acima de 600 µg/kg de peso corporal, são observados aumentos de 1 a 6 vezes na expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1 e aumentos de 3 a 5 vezes para MuRF-1, tanto em músculos brancos, como em vermelhos (MENCONI et al., 2010; SHIMIZU et al., 2011).

O uso de testosterona, que apresenta potente efeito anabólico (aumento da síntese protéica) é capaz de atenuar, em parte, a atrofia induzida por dexametasona, entretanto o aumento observado nas E3 ligases MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 após o uso do glicocorticóide sintético não é revertido (YIN et al., 2009). Corroborando o forte efeito que os glicocorticóides apresentam sobre estas enzimas e a participação delas na proteólise muscular que leva a atrofia.

1.9 Propriedades contráteis no músculo atrofiado por glicocorticóides

Além de afetar a estrutura do músculo esquelético, reduzindo a massa muscular, o uso prolongado do glicocorticóide deixe os músculos progressivamente mais fracos, portanto menos funcionais (PEREIRA; FREIRE DE CARVALHO, 2011).

A aplicação aguda do glicocorticóide exógeno, dependendo do modo de administração e da dose utilizada, pode produzir efeito ergogênico sobre a capacidade contrátil, podendo aumentar a força muscular (MAES et al., 2010). No entanto, de forma crônica o glicocorticóide sintético reduz a força isométrica máxima e aumenta a fadigabilidade do músculo, ou seja, o músculo se torna mais fraco e incapaz de sustentar contrações máximas por muito tempo, pois entra em fadiga mais rápido do que um músculo não exposto ao glicocorticóide exógeno (MIYAKOSHI et al., 2010).

O diafragma é o músculo inspiratório primário. A atrofia deste músculo em conjunto com a menor capacidade contrátil, pode acarretar em importantes prejuízos para pneumopatas, por exemplo (EASON; DODD; POWERS, 2003). Por isso, um grande número de pesquisadores tem procurado investigar o efeito do uso crônico de glicocorticóides sobre a capacidade funcional do diafragma.

Em paralelo a redução na massa muscular, pode aparecer, dependendo da duração do tratamento e da dose utilizada, uma redução de 12% a 26% na força isométrica máxima do diafragma após um período prolongado de aplicação de glicocorticóides sintéticos (EASON; DODD; POWERS, 2003). Além da força máxima, a velocidade de contração do músculo também é afetada, deixando o músculo mais lento, comprometendo seriamente a funcionalidade muscular (SASSOON et al., 2008).

1.10 Aspecto clínico da atrofia do músculo esquelético

Uma série de estudos epidemiológicos vem analisando a associação entre uma baixa massa muscular com taxas de mortalidade. Indivíduos que perdem mais massa muscular durante o envelhecimento apresentam maior risco de mortalidade (BUNOUT et al., 2011), principalmente se esta perda na massa muscular acontecer subitamente (SZULC et al., 2010).

As propriedades contráteis do músculo esquelético, incluindo a força máxima que um músculo pode gerar e a velocidade no qual o músculo responde a estímulos externos (força de

reação), também podem indicar a expectativa de sobrevida dos indivíduos. Aqueles que apresentam músculos menos funcionais apresentam maior risco de quedas, fraturas, morbidade e mortalidade (VISSER; SCHAAP, 2011).

Recentemente, foi demonstrado em experimentação animal, que o bloqueio farmacológico do receptor que interage com a proteína miostatina (importante supressor da massa muscular), impedindo a sua ação, previne e reverte a atrofia muscular induzida por câncer, levando estes animais a uma evidente maior taxa de sobrevida (ZHOU et al., 2010).

Desta maneira, o músculo esquelético não apresenta apenas um aspecto estético ou funcional. A manutenção de uma massa muscular efetivamente apresenta um impacto clínico respeitável. Portanto, meios que combatam a atrofia muscular devem ser explorados. Uma vez que o músculo esquelético é um alvo dos glicocorticóides sintéticos, as consequências destes novos moduladores seletivos do RG sobre aspectos estruturais e funcionais do músculo esquelético irão contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com dois moduladores seletivos do receptor de glicocorticoide, derivados do composto arylpyrazole (L5 e L7) sobre aspectos estruturais, moleculares e funcionais do músculo esquelético, comparando estes compostos com os efeitos atróficos do dexametasona.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste estudo:

- a. Investigar o efeito dos tratamentos sobre o peso da glândula adrenal, do baço e sobre o consumo alimentar;
- b. Investigar o comportamento do peso corporal total durante o tratamento;
- c. Investigar o efeito dos tratamentos sobre a relação peso muscular seco/peso muscular úmido;
- d. Investigar o efeito dos tratamentos sobre o peso absoluto e relativo do músculo sóleo;
- e. Investigar o efeito dos tratamentos sobre a área de secção transversa de diferentes tipos de fibra muscular existentes no músculo sóleo;
- f. Investigar o efeito dos tratamentos sobre a capacidade do músculo sóleo em gerar força (contração tetânica);
- g. Investigar o efeito dos tratamentos sobre a expressão de genes envolvidos na degradação protéica (sistema ubiquitina-proteassoma).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Os protocolos utilizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta instituição (CEUA-ICB/USP).

3.2 Delineamento experimental

Foram utilizados ratos Wistar, com tempo de vida de aproximadamente 2 meses ou pesando aproximadamente 200 gramas. Todos os animais foram mantidos em gaiolas, contendo 3 ou 4 animais, em um regime claro/escuro de 12 horas. As gaiolas eram mantidas no biotério de experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento desta instituição (ICB/USP), tendo ração e água à vontade. Quando os animais chegavam à idade ou peso ideal, eram aleatoriamente divididos em um dos grupos experimentais ou serviam como controles.

Os animais foram tratados ou com dexametasona ou com *arylpyrazole* L5 ou com *arylpyrazole* L7, em uma dose diária, intraperitoneal, sempre no mesmo horário, no período da manhã, por um ou sete dias.

Como o *Arylpyrazole* é um composto novo, ainda não padronizado quanto à sua dose, foi realizado uma curva de dose com três pontos, sendo uma dose considerada baixa, uma intermediária e uma alta, baseado nas doses terapêuticas utilizadas em experimentação animal (ratos) com o dexametasona (CASSOL-JR et al., 2010). A dose considerada baixa foi de 200 µg/kg peso corporal, a dose intermediária foi de 600 µg/ kg peso corporal e a dose alta foi de 1200 µg/kg peso corporal. Já foi demonstrado que a administração dessas doses de dexametasona causam uma significativa atrofia do músculo esquelético (MA et al., 2003). As doses dos compostos *arylpyrazole* foram equimolares ao dexametasona (Dexanil, Neo Química, Anápolis, GO, Brasil). Os compostos *arylpyrazole* foram cedidos por Thomas S. Scanlan, da *Oregon Health and Science University (Portland, Oregon, USA)*. A tabela 3 mostra as doses utilizadas em cada medicamento de acordo com o respectivo peso molecular.

Tabela 3 – Doses utilizadas em cada medicamento de acordo com o peso molecular.

	Dose baixa	Dose intermediária	Dose alta
	(µg/kg peso corporal)	(µg/kg peso corporal)	(µg/kg peso corporal)
Dexametasona	200	600	1200
<i>Arylpyrazole L5</i>	198	588	1176
<i>Arylpyrazole L7</i>	176	528	1056

Regularmente o animal era pesado antes da administração do medicamento ou dos compostos para ajustar a dose ao peso adequado de cada animal. Cada dose era diluída em salina 0,9% até atingir 1.5 ml, para então ser injetado no peritônio dos animais.

Após o respectivo tratamento, cada animal foi sacrificado por deslocamento cervical e o músculo sóleo foi retirado e pesado. O músculo de uma pata foi preparado para histologia, embebido em uma pasta formado com o fígado do próprio animal e imediatamente fixado por congelação com isopentano e estocado em nitrogênio líquido para posterior análise. O músculo da pata contralateral foi guardado no freezer -80 °C para posterior extração do RNA mensageiro (mRNA) para análise da expressão gênica. Para verificar o peso seco do músculo, uma pequena alíquota do músculo foi pesado assim que retirado do animal (peso úmido) e posteriormente foi mantido na estufa à 60 °C por 48 horas e em seguida pesado novamente (peso seco). Após a obtenção dos valores para o peso muscular seco, foi calculado o quanto esta variável representava do peso muscular úmido em porcentagem, estabelecendo uma relação entre o peso seco e o peso úmido. Em paralelo a retirada do músculo sóleo, a glândula adrenal e o baço também foram removidos e pesados, servindo como um controle positivo do tratamento com dexametasona. Todas estas medidas anatômicas foram normalizados pelo comprimento naso-caudal de cada animal.

3.3 Análise do consumo alimentar

Durante todo o tratamento, a quantidade de ração ingerida por gaiola foi mensurado anotando a quantidade (em gramas) de ração que encontrava-se na gaiola após um período de 24 horas. Para encontrar este valor, subtraía-se a quantidade de ração encontrada da quantidade fornecida. Antes da administração do dexametasona ou dos compostos, o consumo

alimentar foi registrado e utilizado como linha de base, a fim de comparar os efeitos de cada droga. Cada gaiola correspondia a uma dose (de dexametasona ou L5 ou L7). Como não houve diferença significativa entre as diferentes doses de cada substância, a análise estatística foi realizada por droga.

3.4 Teste de função muscular

Os animais tratados por sete dias na maior dose foram submetidos ao teste de função muscular antes do sacrifício. Estando o animal sedado com hidrato de Cloral 10% (3 µl/g peso corporal), uma pequena incisão foi feita no tornozelo da pata direita do animal, expondo o tendão do músculo sóleo. Em seguida, os animais foram colocados em uma plataforma e as patas dianteiras e a esquerda foram fixadas com uma fita adesiva. O tendão intacto foi amarrado com uma linha (4-0) ao braço de alavanca de um servomotor (BIOPAC Systems, Goleta, Califórnia, USA), que controla o comprimento muscular e mede a força desenvolvida pelo músculo. O servomotor manda as informações para o computador que foi usado para coletar e analisar os dados do teste utilizando o *programa AcqKnowledge* (BIOPAC Systems, versão 3.9.1.6, para *Windows*).

O músculo foi ativado via nervo ciático utilizando-se um eletroestimulador (BIOPAC Systems), que foi cuidadosamente conectado ao nervo. A pequena região de exposição do tendão foi mantida úmida com solução salina. Primeiramente foi gerado estímulos isolados de 2 V para a determinação do comprimento ótimo do músculo. Este comprimento foi à posição do músculo no qual gerou a maior contração isolada. Com o músculo na posição ótima, foi gerado um estímulo de 4 V (250 Hz) para induzir a contração tetânica. O valor obtido no pico da contração tetânica foi obtido em gramas e normalizado pelo comprimento naso-caudal dos animais.

3.5 Histologia e histoquímica para a ATPase miosínica

O material preparado para a histologia foi afixado sobre uma estrutura rígida com *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (Sakura Finetek, Torrance, Califórnia, USA), para em seguida serem realizadas, com o auxílio de um criostato (CM3050 - Leica, Nussloch, Alemanha), secções seriadas do músculo (10 µm), montando-as sobre lâminas histológicas.

Após a obtenção dos cortes em lâminas histológicas, elas foram submetidas à histoquímica para ATPase miosínica após serem pré-incubadas em pHs ácidos (4.1 e 4.4) ou após serem fixadas em a 4 °C em formol cálcio de Backer (50 ml de formalina 10% e 0,5 g de cloreto de cálcio) e pré-incubadas em pH alcalino (9.8) (GUTH; SAMAHA, 1969).

O tampão acetato contendo acetato de sódio, ácido acético glacial, cloreto de cálcio e água destilada foi utilizado nas soluções com pHs ácidos. Enquanto o tampão glicina, contendo glicina, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, hidróxido de sódio 0,1M e água destilada foi utilizado na solução com pH alcalino.

Após a pré-incubação nas soluções de pHs diferentes os cortes foram lavados em água destilada e incubados com o tampão ATP, contendo ATP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluído em uma parte do tampão glicina (pH de 9.5), por 35 minutos a 37 °C. Em seguida as lâminas foram enxaguadas com água destilada e mantidas em cloreto de cobalto 2% por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em solução 0,5% de sulfeto de amônio por 3 minutos, sendo finalmente enxaguadas com água destilada e fechadas com gelatina-glicerina.

Esta histoquímica marca diferentemente cada tipo de fibra muscular, permitindo a identificação de cada uma delas (STARON et al., 1999). Após a identificação de cada tipo de fibra muscular, foi realizada a determinação da área de secção transversa de cada tipo de fibra que compõe o músculo sóleo, utilizando o programa Image-Pro Plus versão 3.0.01.00 (*Media Cybernetics*, Bethesda, Maryland, USA). Esta técnica permite medidas seguras do nível de atrofia induzida nas fibras musculares.

3.6 Extração do mRNA e reação de transcrição reversa

O RNA foi isolado do tecido muscular usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA é quantificado por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000 - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA), mensurando a absorbância a 260 nm. Por esta técnica também notamos a pureza do RNA fazendo-se a relação entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. Após a quantificação o RNA é submetido à corrida em gel denaturante para uma análise qualitativa, observando-se a presença e a integridade das bandas ribossomais mais abundantes, 28s e 18s.

1µg de RNA extraído é utilizado na reação de transcrição reversa, contendo OligodT (500 µg/ml), 10nM de dNTP Mix, 5x *First Strand Buffer*, 0,1M de DTT e 200 U da enzima

transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). A transcrição reversa é efetuada pelo seguinte protocolo: 70 °C por 10 minutos, adiciona-se a enzima e continua-se a reação a 42 °C por 60 minutos e posteriormente 95 °C por 10 minutos. Com estes procedimentos obtemos o DNA complementar (cDNA) que foi utilizado na análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A expressão gênica foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real, utilizando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Valencia, Califórnia, USA). A reação foi feita com o cDNA, diluído em uma solução contendo: SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA), água MiliQ e os respectivos iniciadores (*primers*) senso e anti-senso, que são altamente específicos para cada gene estudado.

Foram analisados neste estudo os genes que codificam para as seguintes proteínas: MAFbx/Atrogin-1 (*GenBank* número NM 133521.1), MuRF-1 (*GenBank* número NM 080903.1), Trim32 (*GenBank* número NM 001012103.1) e β -actina (*GenBank* número NM 031144.2). Os *primers* que reconhecem os genes acima citados foram confeccionados com o auxílio do programa PerlPrimer (versão 1.1.19) e sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*, Coralville, Iowa, USA). A tabela 4 mostra as sequências dos *primers* utilizados neste estudo. A β -actina foi o gene adotado como controle interno.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* utilizados na análise da expressão gênica.

Gene	Sequência Senso	Sequência Anti-senso
MAFbx/Atrogin-1	TACTAAGGAGCGCCATGGATACT	GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
MuRF-1	TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG	TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG
Trim32	CAGCGGTGGACTCGCGTCGG	GTGTCAAATTCCTGCTGACCGCCC
β -actina	AGTTCGCCATGGATGACGAT	AGTTCGCCATGGATGACGAT

O protocolo utilizado durante a reação obedeceu a seguinte estrutura: 1°- 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, para a ativação das enzimas atuantes e 2°- 40 ciclos de denaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 60 segundos, para a amplificação do cDNA.

A análise da curva de amplificação gerada pelo PCR foi feita com o auxílio do programa da própria máquina. SYBR *Green* PCR *Master Mix* contém um fluoróforo que se liga ao DNA dupla-fita; à medida que o cDNA é amplificado pelo PCR ocorre um aumento na intensidade da fluorescência gerado pelo fluoróforo, que é detectada pela máquina. Uma maior intensidade na fluorescência indica uma maior quantidade de cDNA presente nas amostras, e consequentemente os níveis de mRNA que estavam presentes na reação. O Ct, limiar de ciclagem, representa um ponto que cruza o gráfico da curva de amplificação em algum ponto da fase exponencial e é a base para a quantificação deste método (BUSTIN, 2000).

As alterações na expressão gênica com o tratamento é medida através da fórmula 2^{-DDCt} , onde $DDCt = (Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{controle interno}})_{\text{amostra experimental}} - (Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{controle interno}})_{\text{amostra controle}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), ou seja, a fórmula é baseada nas alterações observadas no Ct, durante o mesmo ciclo entre as diferentes amostras, levando em consideração que é esperado que os valores das amostras controle e os valores do controle interno não se alterem com o tratamento.

3.8 Análise estatística

Os resultados mostrados neste trabalho são apresentados na forma de uma estatística descritiva, expressos como média $\pm$ desvio padrão, com exceção da análise do consumo alimentar que foi expresso como porcentagem da linha de base. A análise estatística foi feita pelo teste de ANOVA. Quando foi encontrado um valor de F significativo, foi aplicado um teste *post-hoc* com ajuste de Tukey. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Para a análise estatística e montagem dos gráficos utilizamos o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, Califórnia, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito dos tratamentos sobre a ingestão alimentar e a massa corporal

Durante o período de tratamento a ingestão alimentar e o comportamento da massa corporal dos animais foram acompanhados. O tratamento com dexametasona resultou em queda de aproximadamente 20% na ingestão alimentar assim que o tratamento começou e esta atenuação persistiu durante todo o tratamento (Figura 4). Interessantemente, enquanto os animais tratados com L7 não mudaram seu padrão alimentar durante o curso do tratamento, a administração de L5 causou um significativo aumento transitório na ingestão alimentar no meio do tratamento (Figura 4).

Figura 4 – Comportamento da ingestão alimentar durante o tratamento com dexametasona (dexa) L5 e L7.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. linha de base

Em comparação com os animais controles, o tratamento com dexametasona provocou uma queda na massa corporal em todas as doses, principalmente a partir do 5º dia tratamento (Figura 5A). Os animais tratados com L5 e L7 apresentaram ganho de massa corporal semelhante aos animais controles (Figura 5B e C).

Figura 5 – Comportamento da massa corporal durante o tratamento com dexametasona (A), L5 (B) e L7 (C).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo controle

Ao analisar as respostas entre as diferentes doses de dexametasona sobre as variáveis: massa corporal e massa muscular; percebemos que a dose alta foi tão eficiente quanto às doses baixa e intermediária. Como veremos mais adiante, na expressão gênica de marcadores de atrofia muscular (MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1), a dose mais alta mostrou uma resposta mais significativa ($p < 0.001$ vs. doses baixa e intermediária). Baseado nestes achados, as análises do efeito dos tratamentos sobre: a massa da glândula adrenal e do baço; a área de secção transversa das fibras musculares e a resposta funcional do sóleo foram realizadas somente na dose alta (1200 $\mu\text{g/kg}$ peso corporal de dexametasona ou doses equimolares de L5 e L7).

4.2 Efeito dos tratamentos sobre a massa da glândula adrenal e do baço

A literatura indica que o tratamento com dexametasona afeta negativamente órgãos linfáticos, promovendo severa apoptose (BAEHR; FURLOW; BODINE, 2011). Da mesma forma, a diminuição nos valores de ACTH após um período de tratamento com dexametasona, leva a atrofia da glândula adrenal (LIN; ACHERMANN, 2004; YUKIOKA et al., 2006). Dessa maneira, o valor encontrado para a massa da glândula adrenal e do baço após um período de tratamento com dexametasona pode servir como um controle positivo do tratamento. Como já era esperado, o tratamento com dexametasona diminuiu significativamente os valores absolutos e relativos tanto da glândula adrenal como do baço. Entretanto, os tratamentos com L5 e L7 não afetaram a massa destas estruturas (Tabela 5).

Tabela 5 – Pesos absoluto e relativo ao comprimento naso-caudal (CNC) da glândula adrenal e do baço após 7 dias de tratamentos na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).

	Adrenal (mg)	Adrenal/CNC (mg/cm)	Baço (mg)	Baço/CNC (mg/cm)
Controle	24.63 ± 2.67	1.23 ± 0.14	879.75 ± 192.4	21.98 ± 24.4
Dexa	13.00 ± 2.51***	0.66 ± 0.14***	326.00 ± 40.7***	8.32 ± 9.0***
L5	28.75 ± 4.50	1.41 ± 0.22	677.25 ± 54.5	16.63 ± 17.8
L7	27.00 ± 2.07	1.37 ± 0.11	775.75 ± 160.4	19.56 ± 21.4

***P < 0.001 vs. grupo controle.

4.3 Efeito dos tratamentos sobre a massa muscular

O tratamento com dexametasona induziu uma queda de aproximadamente 12% na massa do sóleo em todas as doses utilizadas (valores absolutos e relativos). Já os tratamentos com L5 e L7, produziram uma queda significativa na massa do sóleo na dose intermediária (valor relativo), no entanto nos valores absolutos e na dose baixa e alta dos valores relativos esta queda não foi observada (Tabela 6). O comprimento naso-caudal utilizado para a normalização dos valores relativos não mostrou diferença entre os grupos (média = 20.93 ± 0.41).

A relação peso muscular seco/peso muscular úmido aumentou nos animais tratados com dexametasona em todas as doses, refletindo uma diminuição no conteúdo de água no tecido. De forma semelhante o tratamento com L7 aumentou esta relação na dose baixa e na intermediária. O tratamento com L5 não alterou esta proporção em nenhuma dose (Tabela 6).

Tabela 6 – Peso absoluto e relativo ao comprimento naso-caudal do músculo sóleo e a proporção do peso muscular seco em relação ao peso úmido.

	Peso absoluto (g)	Peso relativo (g)	Peso seco/peso úmido (%)
Controle	87.80 ± 9.52	4.27 ± 0.45	27.4 ± 1.60
Dexa – DB	67.75 ± 5.39*	3.29 ± 0.25*	33.34 ± 2.19**
L5 – DB	84.04 ± 15.20	4.09 ± 0.69	23.94 ± 0.93
L7 – DB	83.73 ± 23.21	3.91 ± 1.06	35.23 ± 3.08***
Dexa – DI	70.22 ± 5.61**	3.35 ± 0.23***	31.14 ± 1.25*
L5 – DI	77.38 ± 6.82	3.61 ± 0.31*	24.25 ± 0.22
L7 – DI	77.11 ± 11.52	3.47 ± 0.52*	34.78 ± 2.41***
Dexa – DA	72.68 ± 4.21***	3.49 ± 0.20***	30.97 ± 2.66*
L5 – DA	84.09 ± 6.50	4.02 ± 0.21	24.10 ± 0.34
L7 – DA	90.42 ± 6.04	4.41 ± 0.22	29.34 ± 1.92

NOTA: ABREVIATURAS:

DB – dose baixa

DI – dose intermediária

DA – dose alta

*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs. grupo controle.

4.4 Efeito dos tratamentos sobre a área de secção transversa (AST) em diferentes tipos de fibra muscular existentes no sóleo

O músculo sóleo apresenta fibras musculares do tipo I, IC, IIC e IIA (STARON et al., 1999). As fibras do tipo I são fibras oxidativas; as fibras do tipo IIA são fibras glicolíticas e as fibras IC e IIC são consideradas fibras híbridas, pois elas co-expressam tanto isoformas proteicas existentes nas fibras tipo I, como isoformas proteicas existentes nas fibras tipo IIA, por isso em nossa análise elas foram agrupadas em um mesmo grupo denominado de fibras híbridas IC/IIC.

A fotomicrografia abaixo (figura 6) mostra imagens do mesmo campo visual, de um animal controle, obtidas a partir de duas lâminas histológicas coradas pela reação histoquímica para a atividade ATPase da miosina de cadeia pesada, porém pré-incubadas em soluções com diferentes pHs (4.3 e 9.8). A imagem da esquerda foi pré-incubada em pH 4.3. Neste caso, as fibras musculares coradas em negro indicam fibras tipo I; as fibras mais claras indicam fibras tipo IIA; as fibras coradas em tons de cinza indicam fibras híbridas. A imagem da direita mostra o resultado da lâmina que foi pré-incubada em pH 9.8. Neste caso, as fibras musculares coradas em negro indicam fibras tipo IIA; as fibras coradas em tons mais claros indicam fibras tipo I; as fibras coradas em tons de cinza indicam fibras híbridas. Foi ainda utilizada um segundo pH ácido (4.1) para confirmar a diferenciação dos tipos de fibra muscular encontrada nas lâminas pré-incubadas com os pHs 4.3 e 9.8. O critério para classificação dos tipos de fibra está de acordo com a classificação já descrita na literatura (STARON et al., 1999).

Figura 6 - Fotomicrografia de duas lâminas histológicas coradas pela reação histoquímica para ATPase miosínica pré-incubadas em diferentes pHs.

Para a determinação da AST de cada tipo de fibra muscular encontrado no músculo sóleo dos animais tratados e os controles foi utilizado o pH 4.3. As lâminas pré-incubadas com os pHs 4.1 e 9.8 serviram como auxiliares para a confirmação do tipo de fibra. A figura 7 mostra um campo visual do músculo de um animal de cada grupo. Para cada animal foram computados a AST das fibras existentes em 2 a 3 campos visuais.

Figura 7 – Fotomicrografia mostrando um campo visual de um animal por grupo (pH 4.3).

O tratamento com dexametasona por sete dias na dose alta acarretou em redução na AST em todos os tipos de fibra muscular presentes no sóleo (Tabela 7). Por outro lado, a AST dos animais tratados com L7 foi semelhante à AST dos animais controle em todos os tipos de fibra. Surpreendentemente, a AST dos tipos I e IC/IIC dos animais tratados com L5 foram significativamente maiores que a AST dos animais controle (Tabela 7).

Tabela 7 – Área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras musculares presentes no músculo sóleo após 7 dias de tratamento na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).

Tipo de Fibra	I	IC/IIC	IIA
Controle	2886.58 ± 649.8	2203.91 ± 307.1	2450.68 ± 375.4
Dexametasona	2486.34 ± 617.4***	1999.02 ± 295.8*	2045.58 ± 315.5***
L5	3284.58 ± 573.9***	2442.96 ± 381.8*	2579.43 ± 382.7
L7	2773.40 ± 584.5	2353.72 ± 361.2	2618.06 ± 339.5

*P < 0.05; ***P < 0.001 vs. grupo controle.

4.5 Efeito dos tratamentos sobre a função muscular

Para obter um cenário mais completo da qualidade dos músculos submetidos aos tratamentos, nós conduzimos um teste de função muscular no sóleo dos animais tratados por sete dias na dose alta.

Ao observar a contração tetânica induzida nestes animais, verificamos que o tratamento com dexametasona reduziu significativamente a capacidade do músculo sóleo em gerar tensão (figura 8). Em contrapartida, os animais tratados com L5 e L7 não mostraram atenuação na força produzida em comparação com os animais controle.

Figura 8 – Força tetânica (gramas) relativa ao comprimento naso-caudal (cm) no músculo sóleo de animais tratados na dose alta (1200 µg/kg peso corporal).

*** $p < 0.001$ vs. grupo controle

4.6 Efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica

É bem estabelecido que o sistema ubiquitina-proteassoma é a principal via proteolítica no músculo esquelético; e que a expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 são indicativos da atividade deste sistema em diferentes modelos atroficos.

O tratamento com dexametasona resultou em um aumento dose-dependente na expressão de MAFbx/Atrogin-1 (Figura 9A). Vinte e quatro horas após a administração da droga este efeito já foi visto. Nas doses intermediária e alta este aumento persistiu no 7º dia de tratamento, sendo que o maior valor para este gene foi encontrado no 7º dia de tratamento na dose alta (aumento maior do que 3 vezes). Os tratamentos com L5 e L7 não modularam a expressão de MAFbx/Atrogin-1 (Figura 9B e C).

Figura 9 – Expressão gênica de MAFbx/Atrogin-1.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo controle

O tratamento com dexametasona também resultou em um aumento dose-dependente de MuRF-1 (Figura 10A). No entanto, a expressão de MuRF-1 foi transitória (reduziu do 1º ao 7º dia de tratamento) e menos intensa (aumento de aproximadamente 2 vezes). Interessantemente, os tratamentos com L5 e L7 reduziram significativamente a expressão de MuRF-1 (Figura 10B e C).

Figura 10 – Expressão gênica de MuRF-1.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. grupo controle

Nós também averiguamos a expressão gênica de Trim32, uma enzima que pertence a mesma classe de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 dentro da via ubiquitina-proteassoma (E3 ligase), mas que não está associada com a atrofia muscular. Como esperado, a expressão gênica de Trim32 não foi modulada por nenhum tratamento (Figura 11).

Figura 11 – Expressão gênica de Trim32.

5 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do dexametasona com dois novos compostos moduladores seletivos do RG (L5 e L7) sobre características estruturais, moleculares e funcionais do músculo esquelético. O principal resultado encontrado foi que tanto L5 quanto o L7, no período de uma semana de tratamento, preservam o músculo esquelético da atrofia induzida por glicocorticóides, bem como o músculo sóleo de animais tratados com estes novos compostos conservam a capacidade contrátil.

Nas últimas décadas, ênfases foram colocadas sobre o desenvolvimento e caracterização de novos fármacos com perfil de dissociar o efeito desejável do medicamento dos efeitos colaterais (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010). Os primeiros compostos descritos mostraram resultados promissores nas análises *in vitro*, entretanto, dentro do contexto *in vivo*, estes resultados passam a ser desestimulantes ao ver que efeitos colaterais importantes ainda são mantidos. Contudo, informações recentes apontam um progresso notável sobre novas estratégias para dissociar ações anti-inflamatórias de efeitos colaterais (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010).

Foi demonstrado por análises *in vitro*, que ao nível molecular, os compostos *arylpyrazole* apresentam elevada afinidade ao RG e modulam genes de uma forma diferente que o dexametasona (SHAH; SCANLAN, 2004; WANG et al., 2006). Recentemente, em uma abordagem *in vivo* com camundongos, o L5, mas não o L7, controlou alguns efeitos colaterais que conhecidamente são induzidos por glicocorticóides, como a ausência de redução na síntese de colágeno na pele e no osso (ROOHK et al., 2010). Estas observações sugerem que estes compostos derivados do *arylpyrazole* podem ser ferramentas úteis para investigar o papel de moduladores seletivos do RG em comparação com os glicocorticóides clássicos, verificando a existência de efeitos colaterais em diferentes tecidos.

O uso crônico de glicocorticóides causa alterações significativas na estrutura (atrofia) e na função dos músculos esqueléticos, tornando-os fracos, reduzindo seriamente a qualidade de vida dos pacientes (KAASIK et al., 2007; MINETTO et al., 2010). Atualmente já é comprovado que a perda de massa muscular que ocorre tanto com o uso crônico de glicocorticóides quanto com o envelhecimento, correlaciona-se com uma maior taxa de mortalidade em seres humanos (BUNOUT et al., 2011; SZULC et al., 2010).

Em virtude deste efeito atrófico dos glicocorticóides sintéticos sobre a massa muscular é importante compreender os efeitos *in vivo* destes novos moduladores seletivos, tais como os

compostos *arylpyrazole* no músculo esquelético. Embora já tenha sido demonstrado que o L5 não diminui a síntese proteica no músculo quadríceps, assim como o glicocorticóide sintético prednisolona faz (ROOHK et al., 2010), sabe-se que a atrofia muscular induzida por glicocorticóides ocorre principalmente pela maior ativação das vias proteolíticas, especialmente o sistema ubiquitina-proteassoma (AUCLAIR et al., 1997). Portanto, um estudo analisando com mais detalhes os efeitos destes novos moduladores seletivos sobre o músculo esquelético, abordando também a degradação protéica é oportuno.

Em grande parte, nossos resultados mostram que o L5 e o L7 têm respostas semelhantes, incluindo o efeito sobre a massa corporal, sobre a massa do músculo sóleo e sobre a ingestão alimentar. Como já era esperado o dexametasona provocou uma redução clara em todos estes parâmetros. Ainda, o tratamento com L5 ou L7 não afetou a massa da adrenal como o dexametasona faz. Uma vez que a redução na massa da adrenal é uma resposta clássica de feedback negativo sobre a glândula, os nossos resultados indicam que o L5 e o L7 não têm como alvo a glândula adrenal, dessa maneira esta falta de supressão adrenal pode ser uma vantagem terapêutica destes agentes. Além disso, foi confirmada a redução na massa do baço por tratamento com dexametasona, e novamente nem o L5 nem o L7 mostra qualquer efeito. Da mesma forma, um estudo anterior mostrou que o tratamento com L5 durante uma semana em camundongos, não foi capaz de reduzir o número de células T, células B e células totais no baço. Além do mais, também foi mostrado que o L5 foi incapaz de aumentar as taxas de apoptose e reduzir as taxas de proliferação de linfócitos, assim como o prednisolona fez (ROOHK et al., 2010). Esta falta de efeito sobre a massa do baço sugere que o L5 e o L7 não apresenta potente efeito imunossupressor.

Curiosamente, foi observado uma reposta distinta entre o L5 e o L7 sobre a relação peso muscular seco/peso muscular úmido. Enquanto o L5 não tem qualquer efeito nesta relação, o L7 aumentou este parâmetro de forma semelhante ao dexametasona. Isto significa que em contraste com o L5, o L7 direciona o músculo esquelético para um estado desidratado. Está bem estabelecido na literatura que a administração de glicocorticóide, em curto prazo, apresenta forte efeito de diurese e natriurese, causando a desidratação dos tecidos (LIU et al., 2011; LIU et al., 2010). Esta observação levanta a possibilidade de que o L5 pode apresentar menos sobrecarga renal, em comparação com o L7 e o dexametasona.

Em nosso desenho experimental, os animais foram tratados por até uma semana, o que foi suficiente para confirmar o efeito atrófico do dexametasona sobre a massa e a área de secção transversa de fibras individuais no músculo esquelético. Para o mesmo período de tempo, o tratamento com L5 e com L7 não teve nenhum efeito sobre estes parâmetros, o que

sugere que o músculo esquelético é resistente a esses compostos. Por outro lado, não é possível assegurar, qual seria o resultado do tratamento por períodos mais longos de administração dos compostos, simulando o uso de glicocorticóides por anos em seres humanos. No entanto, deve ser mencionado que uma semana de tratamento em ratos corresponde a vários meses em seres humanos.

Outra limitação dos estudos atuais que abordam moduladores seletivos do RG refere-se à falta de informação sobre o nível de absorção intestinal e de penetração nos tecidos e células. Essa informação poderia melhorar muito a nossa compreensão da ação *in vivo* destes compostos. No entanto, por meio da observação dos diferentes efeitos biológicos encontrados entre as substâncias utilizados neste estudo, é possível tirar algumas conclusões. O efeito de desidratação encontrado no L7 e de forma semelhante no dexametasona sugere a penetração deste composto no rim. Já o aumento transitório no consumo alimentar de animais tratados com L5 sugere que este composto tem penetração no sistema nervoso central, podendo ativar áreas do hipotálamo que controlam o apetite, aumentando o comportamento de comer. Recentemente foi demonstrado que o L5 apresenta impacto negativo sobre o hipocampo (ROOHK et al., 2010), dessa forma, a ingestão de alimentos deve ser levado em consideração no futuro em um possível uso terapêutico deste composto. É possível que os compostos aqui utilizados não tenham penetração no músculo esquelético, contudo, não é possível atualmente distinguir, ao nível tecidual e celular, por qual razão o L5 e o L7 não apresenta efeito negativo sobre o músculo esquelético.

A administração crônica de dexametasona é conhecida por causar uma progressiva, dose-dependente redução no peso corporal, na massa muscular e na ingestão alimentar em ratos (MA et al., 2003). Os nossos animais tratados com dexametasona confirmam estes efeitos. A análise do comportamento do peso corporal durante o tratamento mostra que o dexametasona diminui o peso corporal assim que o tratamento se inicia e esta queda é acompanhada também por uma diminuição na ingestão alimentar. Em contraste, o tratamento com L5 e com L7 é caracterizado por ganho normal na massa corporal e para o tratamento com L7, a ingestão alimentar também é semelhante ao grupo controle. É interessante notar que o tratamento com L5 ocasiona um aumento transitório, mas significativo na ingestão alimentar.

A atrofia muscular induzida por glicocorticóides ocorre principalmente devido à estimulação da proteólise muscular (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008). O sistema ubiquitina-proteassoma é a principal via envolvida, levando a degradação de proteínas intracelulares no músculo esquelético (LECKER et al., 1999). É bem demonstrado na

literatura que os glicocorticóides aumentam a expressão muscular de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1, duas enzimas denominadas devido a sua função como E3 ligases e reconhecidas como marcadores de atrofia muscular, por isso também chamadas de atrogenes (BAEHR; FURLOW; BODINE, 2011; JONES et al., 2010; MENCONI et al., 2010; SHIMIZU et al., 2011). Neste trabalho confirmou-se que a atrofia induzida por dexametasona ocorre em conjunto com uma maior expressão gênica destas enzimas. O tratamento com L5 e com L7 não modulou estes genes, pelo menos no intervalo de tempo analisado no presente estudo (1 e 7 dias). Outra enzima envolvida na ubiquitinação de proteínas-alvo, mas que não é considerado um atrogene, o Trim32, foi avaliado e não foi sensível a qualquer um dos nossos tratamentos, incluindo o tratamento com dexametasona. Esta observação reforça o papel de MAFbx/Atrogin-1 e MuRF-1 como proteínas-chave na atrofia do músculo esquelético. Estes dados moleculares mostram claramente que o L5 e o L7 protegem o músculo esquelético da atrofia, em comparação com o dexametasona, o que está em linha com os efeitos poupadores encontrados na área de secção transversa e na força tetânica, também observados no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o tratamento com L5 ou com L7 (moduladores seletivos do receptor de glicocorticóide) não afeta a estrutura, a resposta molecular do sistema ubiquitina-proteassoma (principal via proteolítica) e a função do músculo esquelético, reforçando o potencial papel destes compostos como um futuro agente terapêutico.

REFERÊNCIAS*

- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Steroidal antiinflammatory drugs: glucocorticoids. *Einstein*, v. 6, n. Supl 1, p. S159-S165, 2008.
- AUCLAIR, D. et al. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. *Am. J. Physiol.*, v. 272, n. 3, p. C1007-1016, 1997.
- BAEHR, L. M.; FURLOW, J. D.; BODINE, S. C. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol.*, v. 589, n. 19, p. 4759-4776, 2011.
- BARRA, G. A. et al. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.
- BELVISI, M. G. et al. Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *J. Immunol.*, v. 166, n. 3, p. 1975-1982, 2001.
- BIANCO, A. C.; RABELO, R. Introdução à fisiologia endócrina. In: AIRES, M. D. M. (Ed.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 741-765.
- BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.
- BUNOUT, D. et al. Association between sarcopenia and mortality in healthy older people. *Australas J. Ageing*, v. 30, n. 2, p. 89-92, 2011.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.
- BUTTGEREIT, F.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. R. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum.*, v. 41, n. 5, p. 761-767, 1998.
- CASSOL-JR, O. J. et al. Low dose dexamethasone reverses depressive-like parameters and memory impairment in rats submitted to sepsis. *Neurosci. Lett.*, v. 473, n. 2, p. 126-130, 2010.
- CLARK, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 275, p. 79-97, 2007.
- DE BOSSCHER, K. Selective glucocorticoid receptor modulators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 120, n. 2-3, p. 96-104, 2010.
- DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 10, n. 4, p. 497-504, 2010.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.*, v. 24, n. 4, p. 488-522, 2003.

EASON, J. M.; DODD, S. L.; POWERS, S. K. Use of anabolic steroids to attenuate the effects of glucocorticoids on the rat diaphragm. *Phys. Ther.*, v. 83, n. 1, p. 29-36, 2003.

FARIA, C.; LONGUI, C. A. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n. 6, p. 983-994, 2006.

FOLETTA, V. C. et al. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflügers Arch.*, v. 461, n. 3, p. 325-335, 2011.

GELFI, C.; VASSO, M.; CERRETELLI, P. Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J. Proteomics*, v. 74, n. 6, p. 774-795, 2011.

GLYNN, E. L. et al. Muscle protein breakdown has a minor role in the protein anabolic response to essential amino acid and carbohydrate intake following resistance exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 299, n. 2, p. R533-R540, 2010.

GOMES, M. D. et al. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

GUTH, L.; SAMAHA, F. J. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.*, v. 25, n. 1, p. 138-152, 1969.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1116 p.

HENCH, P. *The reversibility of certain rheumatic and non-rheumatic conditions by the use of cortisone or of the pituitary adrenocorticotrophic hormone*. 1950. (Nobel Lecture)

HERRLICH, P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*, v. 20, n. 19, p. 2465-2475, 2001.

JONES, A. et al. Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology*, v. 151, n. 8, p. 3706-3719, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 524 p.

KAASIK, P. et al. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 105, n. 1-5, p. 85-90, 2007.

KASSEL, O.; HERRLICH, P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 275, n. 1-2, p. 13-29, 2007.

KIRWAN, J. R.; BALINT, G.; SZEKENYI, B. Anniversary: 50 years of glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 38, n. 2, p. 100-102, 1999.

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 94, n. 5, p. 383-394, 2005.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 9, n. 6, p. 787-793, 2009.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 17, n. 7, p. 1807-1819, 2006.

LECKER, S. H. et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.*, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2004.

_____. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.*, v. 129, n. 1S Suppl, p. S227-S237, 1999.

LEFSTIN, J. A.; YAMAMOTO, K. R. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, v. 392, p. 885-888, 1998.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. *Berne & Levy, fundamentos de fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 815 p.

LIN, L.; ACHERMANN, J. C. The adrenal. *Horm. Res.*, v. 62 Suppl 3, p. 22-29, 2004.

LITTLE, J. P.; PHILLIPS, S. M. Resistance exercise and nutrition to counteract muscle wasting. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, v. 34, n. 5, p. 817-828, 2009.

LIU, C. et al. Glucocorticoids improve renal responsiveness to atrial natriuretic peptide by up-regulating natriuretic peptide receptor-A expression in the renal inner medullary collecting duct in decompensated heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 339, n. 1, p. 203-209, 2011.

_____. Inhibition of dehydration-induced water intake by glucocorticoids is associated with activation of hypothalamic natriuretic peptide receptor-A in rat. *PloS one*, v. 5, n. 12, p. e15607, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J. Pediatr.*, v. 83, n. 5 Suppl, p. S163-171, 2007.

LOWENBERG, M. et al. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids*, v. 73, n. 9-10, p. 1025-1029, 2008.

MA, K. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 285, n. 2, p. E363-E371, 2003.

MAES, K. et al. Corticosteroid effects on ventilator-induced diaphragm dysfunction in anesthetized rats depend on the dose administered. *Resp. Res.*, v. 11, p. 178, 2010.

MATSAKAS, A.; PATEL, K. Intracellular signaling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histol. Histopathol.*, v. 24, n. 2, p. 209-222, 2009.

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 13, n. 3, p. 230-235, 2010.

MENCONI, M. J. et al. Sepsis and glucocorticoids downregulate the expression of the nuclear cofactor PGC-1beta in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 299, n. 4, p. E533-543, 2010.

MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. As glândulas adrenais. In: AIRES, M. D. M. (Ed.). *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 829-841.

MINETTO, M. A. et al. Muscle fiber conduction slowing and decreased levels of circulating muscle proteins after short-term dexamethasone administration in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 95, n. 4, p. 1663-1671, 2010.

MIYAKOSHI, N. et al. Effects of a vitamin D analog, alfacalcidol, on bone and skeletal muscle in glucocorticoid-treated rats. *Biomed. Res.*, v. 31, n. 6, p. 329-336, 2010.

MURTON, A. J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P. L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodeling and atrophy. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1782, n. 12, p. 730-743, 2008.

NECELA, B. M.; CIDLOWSKI, J. A. A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 38, p. 39279-39288, 2004.

NISSEN, R. M.; YAMAMOTO, K. R. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.*, v. 14, n. 18, p. 2314-2329, 2000.

PASSMORE, L. A.; BARFORD, D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.*, v. 379, n. Pt 3, p. 513-525, 2004.

PEREIRA, R. M.; FREIRE DE CARVALHO, J. Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint Bone Spine*, v. 78, n. 1, p. 41-44, 2011.

PETTE, D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v. 90, n. 3, p. 1119-1124, 2001.

_____. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can. J. Appl. Physiol.*, v. 27, n. 4, p. 423-448, 2002.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.*, v. 50, n. 6, p. 500-509, 2000.

REICHARDT, H. M. et al. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *Embo J.*, v. 20, n. 24, p. 7168-7173, 2001.

ROOHK, D. J. et al. Differential in vivo effects on target pathways of a novel arylpyrazole glucocorticoid receptor modulator compared with prednisolone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 333, n. 1, p. 281-289, 2010.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 908 p.

SAINI, A. et al. Powerful signals for weak muscles. *Ageing research reviews*, v. 8, n. 4, p. 251-267, 2009.

SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J. Biol. Chem.*, v. 279, n. 45, p. 46723-46732, 2004.

SASSOON, C. S. et al. Acute effects of high-dose methylprednisolone on diaphragm muscle function. *Muscle Nerve*, v. 38, n. 3, p. 1161-1172, 2008.

SCHACKE, H. et al. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 275, n. 1-2, p. 109-117, 2007.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.*, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHÄCKE, H. et al. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp. Dermatol.*, v. 15, n. 8, p. 565-573, 2006.

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

SCHIAFFINO, S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol.*, v. 199, n. 4, p. 451-463, 2010.

SEENE, T. Turnover of skeletal muscle contractile proteins in glucocorticoid myopathy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 50, n. 1-2, p. 1-4, 1994.

SHAH, N.; SCANLAN, T. S. Design and evaluation of novel nonsteroidal dissociating glucocorticoid receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, n. 20, p. 5199-5203, 2004.

SHIMIZU, N. et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab.*, v. 13, n. 2, p. 170-182, 2011.

STARON, R. S. et al. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.*, v. 111, n. 2, p. 117-123, 1999.

SZULC, P. et al. Rapid loss of appendicular skeletal muscle mass is associated with higher all-cause mortality in older men: the prospective MINOS study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 91, n. 5, p. 1227-1236, 2010.

VAN DER LAAN, S.; MEIJER, O. C. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 585, n. 2-3, p. 483-491, 2008.

VAYSSIÈRE, B. M. et al. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol. Endocrinol.*, v. 11, n. 9, p. 1245-1255, 1997.

VEGIOPOULOS, A.; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 275, n. 1-2, p. 43-61, 2007.

VENTADOUR, S.; ATTAIX, D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 18, n. 6, p. 631-635, 2006.

VISSER, M.; SCHAAP, L. A. Consequences of sarcopenia. *Clin. Geriatr. Med.*, v. 27, n. 3, p. 387-399, 2011.

WANG, J. C. et al. Novel arylpyrazole compounds selectively modulate glucocorticoid receptor regulatory activity. *Genes Dev.*, v. 20, n. 6, p. 689-699, 2006.

WARNMARK, A. et al. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.*, v. 17, n. 10, p. 1901-1909, 2003.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. *Vander, Sherman & Luciano, fisiologia humana: os mecanismos das funções corporais*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 795 p.

YIN, H. N. et al. Regulation of signaling pathways downstream of IGF-I/insulin by androgen in skeletal muscle of glucocorticoid-treated rats. *J. Trauma*, v. 66, n. 4, p. 1083-1090, 2009.

YUKIOKA, M. et al. Adrenocorticotrophic hormone and dehydroepiandrosterone sulfate levels of rheumatoid arthritis patients treated with glucocorticoids. *Mod. Rheumatol.*, v. 16, n. 1, p. 30-35, 2006.

ZHANG, Z. et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res.*, v. 14, n. 4, p. 580-590, 2004.

ZHOU, X. et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*, v. 142, n. 4, p. 531-543, 2010.