

MARCO AURÉLIO SALOMÃO FORTES

IMPACTO DO DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA NA RESPOSTA
HIPERTRÓFICA DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL LONGO
(EDL)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

MARCO AURÉLIO SALOMÃO FORTES

IMPACTO DO DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA NA RESPOSTA
HIPERTRÓFICA DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR DIGITAL LONGO
(EDL)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2013

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

Fortes, Marco Aurélio Salomão.

Impacto do diabetes induzido por estreptozotocina na resposta hipertrófica dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) / Marco Aurélio Salomão Fortes. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia muscular.

Versão do título para o inglês: Impact of streptozotocin-induced diabetes in soleus and extensor digitorum longus (EDL) hypertrophy.

1. Músculo esquelético 2. Diabetes mellitus 3. Hipertrofia muscular
4. mTOR 5. Hiperglicemia I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0204/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marco Aurélio Salomão Fortes.

Título da Dissertação: Impacto do diabetes induzido por estreptozotocina na resposta hipertrófica dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL).

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

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

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. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **011** nas fls. **124** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rui Curi**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Impacto do Diabetes Mellitus na Hipertrofia do Músculo Esquelético*" do qual participam o(s) alunos(s) **Marco Aurélio Salomão Fortes, Phablo Sávio Abreu Teixeira, Diogo Antonio Alves de Vasconcelos**, 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 **14.02.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 20 de março de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Confia no SENHOR de todo o teu coração e não se apoie somente em sua
inteligência – *Provérbios 3.5*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela oportunidade, entendimento, paciência, compreensão, bênçãos, sabedoria e todas as dádivas que me proporciona diariamente. Sem ELE, eu não teria nem começado.

À minha esposa, companheira, que me acompanhou e me carregou durante toda a essa minha jornada, nos momentos bons e nos ruins, com paciência e entendimento. Para ela, o meu amor, meu carinho e o resto da minha vida.

Aos meus avós, gostaria muito que ainda estivessem comigo.

Aos meus pais. Minha mãe, carinhosa, sempre respeita minhas decisões e escolhas e sempre me apoia incondicionalmente, sempre zela por mim, meu anjo particular. Meu pai, meu exemplo, honestidade e responsabilidade, vieram dele, meu modelo para enfrentar tudo que a vida possa lançar em minha direção.

À minha irmã, doutora, meu exemplo de trabalho duro e experiência.

Ao Dr. Carlos Hermano, agradeço pela paciência e disposição para me ensinar. Por me orientar, me ajudar, me moldar como um pesquisador. Pela grande força nos momentos difíceis e por não me deixar desistir, pela força, apreço e pela consideração. A você, minha admiração e respeito. Estamos juntos e vamos para o multiplayer!

Ao Dr. Kaio Vitzel, pela paciência, disposição e ensinamentos oportunos e esclarecedores. Ao amigo Diogo Vasconcelos, pela paciência em me ensinar e passar boa parte do seu tempo comigo. Ao Dr. Lucas Guimarães, pela dedicação e trabalho duro e importantes lições.

À Dr. Tatiana Loureiro, pela paciência em resolver todos os problemas que levei para ela. Pelos ensinamentos e direcionamentos dados no laboratório.

Ao Roberto Mendonça, o Bob, sempre disposto a ajudar em qualquer, hora ou lugar.

Aos vários colegas de laboratórios que fiz em todo o ICB, pessoas que com certeza são especiais.

Aos funcionários José Maria e Paloma, muito obrigado por nunca se esquecerem de mim e cuidarem do meu caminho no ICB.

Aos funcionários da segurança, limpeza, técnicos e os que não me lembrei aqui, meu agradecimento especial, sem vocês, o ICB não caminha.

A todos os amigos que me acompanham a anos. As pessoas próximas, que de alguma forma, me ajudaram.

Ao professor Rui Curi, que depositou sua confiança em mim, me deu a oportunidade de me tornar uma pessoa melhor, o meu respeito

RESUMO

FORTES, M. A. S. **Impacto do diabetes induzido por estreptozotocina na resposta hipertrófica dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL)**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O efeito da hipertrofia induzida por sobrecarga funcional no músculo extensor digital longo (EDL, de contração rápida) e sóleo (contração lenta) de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina foi avaliado. Ratos Wistar (8 semanas de idade) foram induzidos ao estado diabético por dose única de estreptozotocina (65mg/kg de peso corporal, i.v.) e mantidos nessa condição durante quatro semanas. Foi então realizada tenotomia do músculo gastrocnêmio ou ablação do músculo tibial anterior. Os conteúdos de Akt e S6 totais e fosforiladas foram avaliados após uma e quatro semanas de sobrecarga nos músculos EDL e sóleo. No EDL, após 7 dias de sobrecarga na pata hipertrofiada, o conteúdo de Akt total não se alterou, mas ocorreu aumento de fosfo-Akt (Thr³⁰⁸) em 2,1 vezes nos controles e em 1,5 vezes nos diabéticos. Os conteúdos de fosfo-S6 (Ser^{240/244}) e S6 total aumentaram em 2,1 vezes e 4 vezes, respectivamente no grupo diabético e em 4,8 e 3,6 vezes, respectivamente no controle, no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga. Os aumentos induzidos pela sobrecarga nos conteúdos de fosfo-Akt, fosfo-S6 e S6 total no músculo EDL foram semelhantes entre os grupos. No músculo sóleo, os conteúdos de Akt total (em 2,7 vezes em ambos os grupos) e fosfo-Akt (em 2,2 vezes no controle e 2,6 vezes no diabético) aumentaram, após 7 dias de sobrecarga. O conteúdo de S6 total não apresentou diferença enquanto que o de fosfo-S6 aumentou em 4,7 vezes no controle e em 2,8 vezes no grupo diabético. A área da secção transversa das fibras (CSA), a massa, as forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas, foram avaliadas nos músculos sóleo e EDL após 4 semanas de sobrecarga. Aumentos similares na massa muscular e CSA foram observados nos músculos EDL e sóleo nos animais diabéticos e controles em resposta à sobrecarga. Os animais diabéticos apresentaram aumento semelhante nas forças tetânica e força isotônica absolutas em comparação aos controles. A sobrecarga funcional aumentou a expressão do gene da FAK e reduziu de MuRF-1, Atrogina-1 e Miostatina no músculo sóleo, conforme indicado por análise em RT-PCR. A expressão do gene IGF-1 Eb se elevou devido à hipertrofia no músculo sóleo e EDL. Estes resultados são indicativos de que a deficiência de insulina por até 4 semanas não afeta de modo significativo a resposta hipertrófica induzida por sobrecarga funcional nos músculos sóleo e EDL de ratos.

Palavras-chave: Músculo esquelético. *Diabetes mellitus*. Hipertrofia muscular. mTOR. Hiperglicemia.

ABSTRACT

FORTES, M. A. S. **Impact of streptozotocin-induced diabetes in the hypertrophic response of the soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles.** 2013. 109 f. Master Degree Dissertation (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The effects of hypertrophy induced by functional overload on fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) and soleus (slow-twitch) muscles of streptozotocin-induced diabetic rats were evaluated. Male Wistar rats (8 weeks old) were rendered diabetic by a single dose of streptozotocin (65mg/kg b.w., i.v.) and maintained under this condition for four weeks. Tenotomy of the gastrocnemius muscle or tibialis anterior ablation were then performed. Contents of total and phosphorylated Akt and S6 were evaluated after one and four weeks of overload in EDL and soleus muscles. After 7 days of overload, contents of total Akt were not altered on EDL. However, phospho-Akt content was increased (Thr³⁰⁸) by 2.1 and 1.5-fold in control and diabetic animals respectively in the hypertrophied EDL muscle. Contents of phospho-S6 (Ser^{240/244}) and total S6 were increased after 7 days of overload either in the control (by 2.1 and 4-fold respectively) and diabetic (by 4.8 and 3.6-fold, respectively) groups. Increases in the contents of phospho-Akt, phospho-S6 and total S6 in the EDL muscle were similar between groups. After 7 days of overload, increases in contents of total Akt (2.7-fold in both groups) and phospho-Akt (by 2.2-fold in the control and 2.6-fold in diabetic groups) were observed in the soleus muscle. Contents of total S6 in the soleus muscle remained unchanged, whereas the content of phospho-S6 was increased by 4.7-fold in the control and by 2.8-fold in diabetic group due to overload. Fiber cross-sectional area (CSA), muscle mass, and tetanic forces were evaluated after four weeks of overload. Increases in muscle mass and CSA were observed in EDL and soleus muscles of diabetic and control rats. Diabetic animals showed similar increase in absolute tetanic force and twitch force when compared to controls. As indicated by RT-PCR, FAK gene expression was increased, whereas that of MuRF-1, Atrogin-1 and Myostatin was reduced by functional overload in the soleus muscle. Gene expression of IGF-1 Eb was increased due to hypertrophy in the soleus and EDL muscle. These results indicate that a deficiency of insulin for up to 4 weeks has no significant effect on the hypertrophic response induced by functional overload on the EDL and soleus muscles.

Key words: Skeletal muscle. *Diabetes mellitus*. Skeletal muscle Hypertrophy. mTOR. Hyperglycemia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Estratégias experimentais	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Músculo esquelético	15
3.2 Hipertrofia muscular	15
3.2.1 Hipertrofia muscular esquelética induzida por fatores hormonais.....	18
3.2.1.1 IGF-1.....	18
3.2.1.2 GH.....	19
3.2.1.3 Testosterona.....	20
3.2.2 Hipertrofia muscular esquelética induzida por fatores mecanotransducionais.....	20
3.2.3 Modelos de hipertrofia.....	22
3.2.3.1 Treinamento de força.....	22
3.2.3.2 Estimulação elétrica.....	22
3.2.3.3 Alongamento crônico.....	23
3.2.3.4 Sobrecarga compensatória.....	23
3.3 Diabetes mellitus	24
3.3.1 Diabetes induzido por estreptozotocina	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Animais	26
4.2 Desenho experimental	26
4.3 Indução ao <i>diabetes mellitus</i>	27
4.4 Cirurgia de ablação sinergista	27
4.5 Análise gravimétrica dos músculos sóleo e EDL	28
4.6 Teste de força muscular e resistência à fadiga	28
4.7 Análise histológica dos músculos sóleo e EDL	30
4.8 Western blotting	30
4.9 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR	31
4.10 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Caracterização do estado diabético	34

5.2	Análise gravimétrica dos músculos EDL e sóleo.....	35
5.3	Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas, no músculo EDL.....	38
5.4	Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas, no músculo sóleo.....	40
5.5	Resistência à fadiga.....	42
5.6	Área de secção transversa dos músculos sóleo e EDL.....	47
5.7	Conteúdos das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas no músculo EDL..	49
5.8	Conteúdos das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas no músculo sóleo.....	54
5.9	Expressão gênica de FAK, Wnt7a, MuRF-1, Atrogina-1, IGF-1 Eb, Miostatina, Folistatina, Ankrd2 e Axina2 avaliada por RT-PCR no músculo EDL.....	60
5.10	Expressão gênica de FAK, Wnt7a, MuRF-1, Atrogina-1, IGF-1 Eb, Miostatina, Folistatina, Ankrd2 e Axina2 avaliada por RT-PCR no músculo sóleo.....	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICE – Quadro de resultados.....	84

1 INTRODUÇÃO

A hipertrofia do músculo esquelético é definida como o seu aumento em diâmetro, sem acréscimo no número de fibras musculares sendo acompanhado de síntese de proteínas e força contrátil elevadas (SARTORELLI; FULCO, 2004). As condições fisiológicas que promovem crescimento do músculo esquelético do adulto, o fazem por meio do aumento da síntese de proteínas miofibrilares contráteis e diminuição da degradação de proteínas sarcoplasmáticas. O tamanho das fibras musculares é controlado por dois processos paralelos: perda ou acréscimo de mionúcleos e renovação de proteínas sarcoméricas (SANDRI et al., 2013). As vias que controlam a renovação celular e de proteínas são diferentes bem como a contribuição de cada uma para a hipertrofia muscular. As intervenções genéticas podem não ser a melhor estratégia para estimular a hipertrofia, pois genes relacionados ao ganho de massa muscular quando alterados comprometem mais a renovação celular do que a síntese de proteínas (SCHIAFFINO et al., 2013).

A insulina estimula a síntese de proteínas no músculo esquelético (SANDRI, 2008; SCHIAFFINO et al., 2013). Em estados de deficiência de insulina, como *diabetes mellitus* tipo 1, ocorre redução na síntese e aumento na degradação de proteínas, levando à perda da massa muscular esquelética (BARAZZONI et al., 2004). Animais com *diabetes mellitus* induzido por administração de estreptozotocina apresentam aumento da atividade proteolítica muscular em curto prazo (1-3 dias após a indução do diabetes) que retorna a valores semelhantes aos controles após 5 a 10 dias (PEPATO et al., 1996).

A miostatina (GDF-8 *growth/differentiation factor* - 8) é de fundamental importância na hipertrofia. Ela faz parte da família dos TGF- β (*transforming growth factor* - β) que compreendem fatores de crescimento e de diferenciação celulares (MCPHERRON et al., 1997). O aumento na expressão de miostatina em curto-prazo está associado à severidade da perda de massa muscular, sendo esta revertida pelo tratamento com insulina (CHEN et al., 2009). Após longo período de diabetes (aproximadamente 8 semanas), a expressão de miostatina retorna ao valor dos controles (BARAZZONI et al., 2004; CHEN et al., 2009).

A hiperglicemia causa redução da massa muscular esquelética. Miotubos expostos a altas concentrações de glicose (10-25 mM) apresentam aumento na

degradação e diminuição na síntese de proteínas por auto-fosforilação da proteína quinase R (PKR - *double-stranded-RNA-dependent protein kinase*) que fosforila a p38MAP-quinase ativando a fosfolipase A₂. A ativação desta promove liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana e gera espécies reativas de oxigênio (EROs) (HAYAMA et al., 2002; RUSSELL et al., 2009). As EROs causam efeitos deletérios e complicações no diabetes por modificações químicas em lipídios e proteínas (BAYNES, 1991). Causam também redução nos conteúdos de *MyoD*, miogenina e miosina de cadeia leve e inibição na formação de novas fibras musculares (GRZELKOWSKA-KOWALCZYK et al., 2013). *MyoD* é um fator de transcrição associado ao comprometimento de uma célula progenitora para o programa miogênico. A miogenina é expressa na fase terminal de diferenciação, necessária para a fusão de miócitos e formação de miotubos (BENTZINGER et al., 2012).

O tratamento com concentração elevada de glicose (10-25 mM) leva à ativação da apoptose em miotubos murinos mediada por caspases 3 e 8 sendo acompanhada de ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (RUSSELL et al., 2009). Este é um mecanismo importante da perda de massa muscular esquelética no estado diabético (RUSSELL et al., 2009).

O modelo de sobrecarga funcional por ablação da musculatura sinergista é a abordagem experimental mais utilizada para o estudo dos mecanismos envolvidos na hipertrofia do músculo esquelético (ROSENBLATT; PARRY, 1992; PHELAN; GONYEA, 1996; BODINE et al., 2001; ISHIDO et al., 2006; PATURI et al., 2010; KATTA et al., 2010). A hipertrofia dos músculos extensor digital longo (EDL) e sóleo é induzida por ablação do tibial anterior e tenotomia do gastrocnêmio, respectivamente (BODINE; BAAR, 2012; BOOTH; THOMASON, 1991). A hipertrofia por sobrecarga funcional está associada à ativação da via de sinalização da mTOR. Rosenblatt e Parry (1992) demonstraram que ativação, proliferação e fusão de células tronco musculares são essenciais para a hipertrofia compensatória após ablação sinergista. O tratamento com rapamicina atenua mas não inibe a hipertrofia muscular induzida por sobrecarga funcional após ablação sinergista (BODINE et al., 2001). Além desse fator, o envelhecimento e a ativação da AMP-quinase estão associados ao menor crescimento da massa muscular induzido por sobrecarga funcional (RIVAS et al., 2011; THOMSON; GORDON, 2005).

Pouco se sabe sobre o efeito do *diabetes mellitus* nas adaptações ou respostas da massa muscular esquelética ao exercício resistido e sobrecarga funcional. Paturi e colaboradores (2010) demonstraram que a hipertrofia por sobrecarga funcional no músculo sóleo de ratos Zucker (obesos e com resistência à insulina) é menor comparada a dos animais controles. Há menor ativação da via de sinalização da mTOR (SITNICK; BODINE; RUTLEDGE, 2009) caracterizada por menor fosforilação de p70S6-quinase e aumento de TSC1/TSC2 (hamartina/tuberina) no músculo sóleo de animais obesos submetidos à hipertrofia (PATURI et al., 2010). Menor ativação da via da mTOR também foi demonstrada por Katta e colaboradores (2010) no músculo sóleo de ratos Zucker com hipertrofia induzida por sobrecarga funcional (KATTA et al., 2010). Não há evidências do efeito do estado diabético sobre a hipertrofia do músculo extensor digital longo (EDL) que apresenta predominância de fibras musculares brancas. Em experimentos realizados pelo nosso grupo verificou-se que o músculo EDL de animais com diabetes induzido por estreptozotocina apresenta maior perda de massa quando comparado ao sóleo. Houve diminuição do número total de células-tronco musculares no músculo EDL de ratos diabéticos e diminuição das capacidades proliferativa e de fusão dessas durante a miogênese *in vitro* que não foi revertida pelo tratamento com insulina (3U/dia). Quando submetidos à lesão muscular por injeção de cardiotoxina, os animais controles recuperaram espontaneamente a força muscular ao contrário dos diabéticos que continuaram com a função comprometida. Animais diabéticos induzidos por estreptozotocina também apresentaram aumento da fosforilação de AMP-quinase (AMPK) com efeito negativo sobre a hipertrofia muscular por reduzir a ativação das proteínas da via da mTOR: Akt em Ser⁴⁷³, mTOR em Ser²⁴⁴, *ribosomal protein S6 kinase* em Thr³⁸⁹ e *eukaryotic initiation factor (eIF4E)-binding protein* em Thr³⁷ (BOLSTER et al., 2002; THOMSON; GORDON, 2005).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o impacto do estado diabético induzido por dose única de estreptozotocina (65 mg/kg de peso corpóreo), por via intraperitoneal, sobre a hipertrofia durante 7 e 30 dias nos músculos sóleo e EDL

2.1 Estratégias experimentais

Foram avaliados:

1. A hipertrofia (massa) nos músculos sóleo e EDL submetidos à sobrecarga funcional nos animais diabéticos e controles;
2. A função contrátil (forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas, e resistência à fadiga);
3. A área da secção transversa (por análise histológica);
4. Marcadores da via de sinalização de síntese, conteúdos de Akt total e fosforilada (Thr³⁰⁸), S6 total e fosforilada (Ser^{240/244}) e de degradação de proteínas, conteúdos de Atrogina-1 e MuRF-1 pertencentes ao sistema ubiquitina-proteassoma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Músculo esquelético

O músculo esquelético é constituído por células longas, tubulares e multinucleadas denominadas fibras musculares ou miofibras. Estas se desenvolvem de mioblastos para formar o músculo por meio de um processo chamado de miogênese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Cada uma das miofibras contém miofibrilas com longas cadeias de sarcômero. O sarcômero é a unidade funcional de repetição do músculo. As miofibrilas consistem de filamentos menores chamadas miofilamentos. Existem dois tipos de miofilamentos: os filamentos grossos são constituídos principalmente de miosina e os finos compostos de actina. O conjunto de sarcômeros empilhados e em paralelo compõem a miofibrila sendo altamente organizados no interior do músculo esquelético e conferindo aparência estriada (BORON; BOULPAEP 2009). Os vários núcleos se localizam na periferia, nas proximidades do sarcolema das fibras musculares esqueléticas. As fibras musculares estão organizadas em feixes e são separadas entre si por um tecido conjuntivo chamado endomísio. Os feixes são envolvidos por outra camada de tecido conjuntivo chamada perimísio. O músculo esquelético é envolvido por um tecido fibroso chamado endomísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). As fibras musculares são classificadas como do tipo I ou lentas e tipo II ou rápidas. Esta última se classifica ainda em dois subtipos; tipo IIA e IIB. Mais recentemente, foi incluído mais um subtipo chamado IIX, que é uma fibra intermediária entre IIA e IIB (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2012).

3.2 Hipertrofia muscular

A hipertrofia muscular esquelética ocorre quando há aumento na massa muscular por ampliação no diâmetro das fibras musculares, sem acréscimo no número de fibras, sendo acompanhado de síntese de proteínas e força contrátil elevada (GLASS, 2005; SARTORELLI; FULCO, 2004).

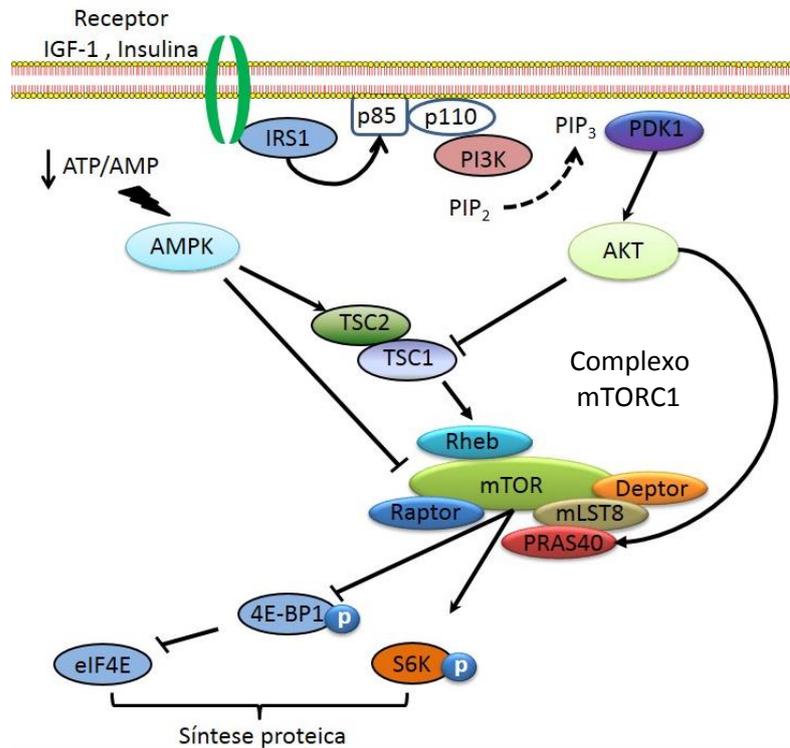
O crescimento do músculo ocorre por aumento da síntese de proteínas miofibrilares contráteis, diminuição da degradação de proteínas sarcoplasmáticas e proliferação, diferenciação e fusão células progenitoras miogênicas (ADAMS, 2006;

GILSON et al., 2009; GLASS, 2005; SANDRI, 2008; SARTORELLI; FULCO, 2004; SCHIAFFINO et al., 2013, 2013; TATSUMI, 2010; VERDIJK et al., 2009; VIERCK et al., 2000)

A via de síntese de proteínas (Figura 1) é ativada quando a mTOR (*mammal target of rapamycin*) é fosforilada (LAPLANTE; SABATINI, 2009; SCHIAFFINO et al., 2013). A ligação de fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃) ao domínio da Akt leva esta a translocar-se para a membrana plasmática. A Akt é fosforilada por fosfoinositídeo-1 3-fosfato-quinase dependente (PDK1) e pode ser ativada pelo complexo mTORC2 (ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011). Esses dois eventos de fosforilação são necessários para a ativação completa da Akt (HAY; SONENBERG, 2004). Essa proteína interage com inúmeras outras (PRAS40 e complexo TSC) para formar o complexo mTORC1 (abaixo), principal fator responsável pela ativação da síntese proteica fosforilando outros constituintes dessa via (MA; BLENIS, 2009). O complexo mTORC1 envolve cinco elementos regulatórios: *mTOR* (*mammal target of rapamycin*), *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (*mLST8*, ou *GβL*), *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (*Deptor*) e *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (*PRAS40*) (PETERSON et al., 2009). A Akt promove então a síntese de proteínas quando por fim ocorre a fosforilação do fator de iniciação eucariótico 4E (*eIF4E-binding protein 1* (4E-BP1) e da *p70 ribosomal S6 kinase 1* (S6K1). A fosforilação da proteína S6K1 leva a um aumento na transcrição do mRNA de proteínas miofibrilares (MAYER et al., 2004).

No final da sequência de nucleotídeos do mRNA há uma estrutura especificamente reconhecida por eIF4E que se une a esta e juntamente com uma helicase iniciam a tradução ribossomal por facilitar a ligação da subunidade 40S do ribossomo ao mRNA (GINGRAS et al., 1999). O 4E-BP1 é um peptídeo inibitório que se liga à eIF4E não permitindo a sua interação com a proteína eIF4G, anulando a ligação destes ao ribossomo (RICHTER; SONENBERG, 2005). A fosforilação de 4E-BP1 não permite a sua ligação em eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) e a deixa livre para promover a síntese proteica (RICHTER; SONENBERG, 2005).

Figura 1 – Principais sinalizadores envolvidos na via de síntese de proteínas.



Quando ocorre a ligação do IGF ou insulina ao seu respectivo receptor o substrato do receptor de insulina 1 (IRS1) é recrutado e fosforilado, dando início à ativação da via PI3K. Após fosforilação de IRS, esta recruta as subunidades p85 e p110 que formam a PI3K. A PI3K adiciona um fosfato ao *phosphatidylinositol-2 phosphate* (PIP₂) transformando-o em *phosphatidylinositol-3 phosphate* (PIP₃). PIP₃ é um sítio de ligação para PDK1 e Akt localizado na membrana. PDK1 fosforila Akt em resposta ao aumento de PIP₃. Akt fosforilada fosforila 2 alvos subsequentes: o complexo TSC1/TSC2 e a PRAS40 (LAPLANTE; SABATINI, 2009). PRAS40 é uma proteína inibitória do complexo mTORC1, e quando fosforilada se dissocia do complexo permitindo que este seja ativado. O complexo TSC1/TSC2 ativa a proteína Rheb que subsequentemente estimula mTORC1 (LAPLANTE; SABATINI, 2009). Depois de ativado, o complexo mTORC1 fosforila o fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) e a p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1). A fosforilação em 4EBP-1 impede a sua ligação a eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) e promovendo a síntese proteica por induzir a tradução do mRNA junto ao ribossomo. Abreviaturas: IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1*; PIP₂ – *phosphatidylinositol-2 phosphate*; PIP₃ – *phosphatidylinositol-3 phosphate*; PI3K – *phosphatidylinositol 3-kinase*; IRS1 – *Insulin Receptor Substrate 1*; AKT – *Protein Kinase B*; TSC – *Tuberous Sclerosis Complex*; TSC1 – *hamartin*; TSC2 – *tuberin*; mTORC1 – *mammalian target of rapamycin complex 1*; eIF4E – *eukaryotic translation initiation factor 4E*; 4E-BP1 – (*eIF4E*)-binding protein 1; S6K – p70 ribosomal S6 kinase 1; AMPK – *AMP-activated protein kinase*; p – fosforilação. Os artigos que subsidiaram a elaboração da figura foram: ALESSI et al., 1997;; BARAZZONI et al., 2012; BODINE, 2006; HAY; CARPENTER et al., 1990; GLASS, 2003; LAPLANTE; SABATINI, 2009; MIYAZAKI et al., 2011; SONENBERG, 2004; STOKOE, 1997, 2012; VANDER HAAR et al., 2007

3.2.1 Hipertrofia muscular esquelética induzida por fatores hormonais

Alguns hormônios estimulam a síntese de proteínas miofibrilares, causando hipertrofia do músculo esquelético. Os principais são: IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), testosterona e GH (hormônio do crescimento) (SCHOENFELD, 2013; SERRA et al., 2011).

3.2.1.1 IGF-1

O IGF-1 é um fator de crescimento estruturalmente semelhante à insulina. Regula o crescimento, diferenciação, regeneração e manutenção da homeostase do tecido muscular no adulto (DUAN; REN; GAO, 2010; SARTORELLI; FULCO, 2004). Três isoformas de IGF-1 foram identificadas nos seres humanos: IGF-1Ea, IGF-1Eb e IGF-1Ec. As isoformas IGF-1Ea e IGF-1Eb são produzidas essencialmente no fígado (GOLDSPINK, 2005; ROTWEIN, 1986; SCHOENFELD, 2013). O IGF-1Ec (em roedores existem somente duas isoformas, e este é chamado IGF-Eb) é uma variante do gene de IGF-1, também chamado de MGF (*Mechano-growth factor*), sendo expresso exclusivamente no tecido muscular, em resposta a uma sobrecarga mecânica e exerce influência de forma autócrina/parácrina no músculo esquelético (GOLDSPINK, 2005).

Animais *knockout* para os genes de IGF apresentam peso corporal 30% menor e ao nascer tem 60% do peso corporal dos animais controles (BAKER et al., 1993; LIU et al., 1993). Quando o gene do IGF é superexpresso, o peso dos animais é elevado em até 20% (CRISWELL et al., 1998).

O IGF ativa diferentes vias de sinalização, incluindo: a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)-Akt-mTOR, MAPK quinase regulada por sinal extracelulares (ERK) e calcineurina dependentes de Ca^{2+} (HADDAD; ADAMS, 2004; ROMMEL et al., 2001; SEMSARIAN et al., 1999). O IGF e a insulina promovem síntese de proteínas via (PI3K)-Akt-mTOR (BARK et al., 1998) e diminuem a degradação de proteínas por inibir a via FOXO3 (Forkhead box O3) (GOLDSPINK, 2002; LIU et al., 2006; VELLOSO, 2008). Bark e colaboradores (1998) relataram hipertrofia nos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio após infusões repetidas de IGF recombinante (3.3 nmol/hr) por via intravenosa mesmo em camundongos submetidos a jejum (BARK et al., 1998). Tomas e colaboradores (1992) mostraram que o IGF (695 µg/dia)

promove hipertrofia mesmo em condições catabólicas. Neste caso, os ratos foram tratados com dexametasona e todas as alterações causadas por esta droga foram revertidas pela administração do IGF (TOMAS et al., 1992).

Rommel e colaboradores (2001) trataram mioblastos C2C12 em cultura com IGF (10 ng/mL) e observaram aumento da área da secção transversa dos miotubos e ativação da via de síntese proteica por fosforilação de Akt e p70S6K (em Ser⁴⁷³ e Thr³⁸⁹, respectivamente) (ROMMEL et al., 2001).

3.2.1.2 GH

O GH apresenta efeitos semelhantes aos do IGF-1 (VELLOSO, 2008). O GH é constituído de 191 aminoácidos sendo produzido nas células somatotróficas da hipófise anterior, sendo secretado de forma pulsátil ao longo do dia, com pico durante o sono no adulto (SCHOENFELD, 2013; VELLOSO, 2008). O GH age por meio de ligação a receptores específicos e indiretamente pela produção de IGF-1 no fígado (SERRA et al., 2011; WEST; PHILLIPS, 2010).

Este hormônio medeia processos catabólicos e anabólicos (VELLOSO, 2008). Estimula a degradação de triacilgliceróis, captação de aminoácidos e síntese de proteínas (GRAVHØLT et al., 1999; VIERCK et al., 2000). Injeções diárias de GH causam aumento significativo no tamanho das fibras musculares e no número de células satélites. Aumenta também o número de mionúcleos nos músculos EDL e sóleo de ratos (MCCALL et al., 1998; SCHOENFELD, 2013; VELLOSO, 2008).

McCall e colaboradores (1998) mostraram que músculos sóleos de ratos submetidos à sobrecarga funcional por ablação dos músculos plantar e gastrocnêmio sofrem hipertrofia. Contudo, quando uma combinação de GH/IGF-1 foi injetada, a hipertrofia foi mais pronunciada conforme dados da massa muscular, área de secção transversa e quantidade de mionúcleos (MCCALL et al., 1998).

Giannoulis e colaboradores (2008) verificaram que diferentes doses de GH (na dose de 0,1 mg/dia) causam hipertrofia muscular esquelética e aumentam a massa magra corporal total em idosos, quando avaliadas por tomografia computadorizada (GIANNOULIS et al., 2008).

3.2.1.3 Testosterona

A testosterona é um potente hormônio anabólico que estimula a síntese proteica e a captação de aminoácidos para o interior das células resultando em balanço nitrogenado e proteico positivos (VINGREN et al., 2010). A testosterona estimula a síntese de proteínas específicas por atravessar a membrana celular e ligar-se ao seu receptor intracelular. Isso resulta no transporte do complexo testosterona/receptor para o núcleo da célula onde medeia a transcrição gênica (SCHULTHEISS, 2010; VINGREN et al., 2010).

Homens apresentam concentrações circulantes de testosterona 10 vezes mais elevadas que aquelas encontrados em mulheres. Este fato contribui para o aumento da massa muscular em homens no início da puberdade (HARRIDGE, 2007). O efeito hipertrófico da testosterona (BHASIN *et al.*, 1996; GIANNOULIS *et al.*, 2008; SINHA-HIKIM *et al.*, 2006) é aumentado significativamente quando combinado com o treinamento de força (BHASIN; WOODHOUSE; STORER, 2001). Bhasin e colaboradores (1996) realizaram um estudo duplo-cego randomizado, no qual 43 jovens do sexo masculino foram escolhidos para receber placebo, placebo mais treinamento de força, 100 mg por semana de enantato de testosterona ou 100 mg por semana enantato de testosterona mais treinamento de força. O grupo que recebeu somente testosterona aumentaram a massa magra e a área de secção transversa do quadríceps. Contudo, os efeitos da testosterona combinados com o treinamento de força foram mais pronunciados (BHASIN et al., 1996).

Sinha-Hikim e colaboradores (2002) estudaram os efeitos da administração de enantato de testosterona nas doses de 125, 300 ou 600 mg por semana por 20 semanas e relataram que o tamanho da fibra aumentava de maneira dose-dependente (SINHA-HIKIM et al., 2002).

3.2.2 Hipertrofia muscular esquelética induzida por fatores mecanotransducionais

O músculo esquelético converte sinais mecânicos (energia mecânica) em eventos bioquímicos que regulam a síntese protéica. Este processo é chamado de mecanotransdução (HORNBERGER; ESSER, 2004). As alterações mecânicas mais evidentes no músculo esquelético estão associadas com proteínas de adesão e o

aparelho contrátil. O sarcolema e o citoesqueleto também sofrem deformação e são importantes sensores de deformação mecânica (BURKHOLDER, 2007).

Mudanças conformacionais induzidas mecanicamente do músculo esquelético ativam direta e indiretamente a síntese de proteínas (BURKHOLDER, 2007). As alterações mecanicamente induzidas na síntese de proteínas ocorrem independentemente de hormônios ou fatores de crescimento circulantes (PALMER et al., 1983; VANDENBURGH et al., 1999)

Séries repetidas de exercícios físicos contra uma determinada resistência (chamado de treino de força) promovem crescimento compensatório do músculo esquelético (KIMBALL; FARRELL; JEFFERSON, 2002).

A transmissão de força ocorre por meio dos costâmeros ou placas de adesão focal que são ricos em moléculas sinalizadoras e apresentam capacidade adesiva (BAUM et al., 2000; DANOWSKI et al., 1992). As principais moléculas de adesão no músculo esquelético são distroglicana e integrinas (COHN et al., 1999; COLOGNATO; WINKELMANN; YURCHENCO, 1999), ambas receptores de laminina que é parte ativa importante da lâmina basal e influencia a diferenciação, migração, adesão e sobrevivência celulares (TIMPL et al., 1979). A ligação da integrina e distroglicana aos seus alvos (por exemplo a proteína FAK) na matriz extracelular leva os sinais da placa de adesão focal e da rede da matriz extracelular para o núcleo (COLOGNATO; WINKELMANN; YURCHENCO, 1999; HILENSKI; TERRACIO; BORG, 1991). As placas de adesão se ligam à matriz contrátil por meio de uma rede de filamentos intermediários (BURKHOLDER, 2007). Uma extensa rede de sinalização envolvendo proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) está associada à integrina (CARSON; WEI, 2000; INGBER, 1997). Este sistema é modulado pela sinalização de deformação e quantidade de carga aplicada (IQBAL; ZAIDI, 2005; SAWADA; SHEETZ, 2002).

A primeira molécula de sinalização a ser identificada foi a quinase de adesão focal (FAK). Essa proteína regula a renovação de moléculas de adesão, ativação de GTPases, migração celular e *cross-talk* entre a sinalização de fatores de crescimento e integrinas (MITRA; HANSON; SCHLAEPFER, 2005). O conteúdo de FAK aumenta durante a hipertrofia estimulada por sobrecarga funcional no músculo sóleo de ratos e durante a fusão de mioblastos em miotubos maduros demonstrando seu provável potencial em estimular o aumento da massa muscular esquelética (FLÜCK et al., 1999).

A FAK autofosforilada em tirosina 397 ativa a proteína p70S6K (*p70 ribosomal S6 kinase 1*) elemento importante da via mecano-sensorial. Essa via independe da fosforilação prévia de Akt e aumenta a massa muscular induzida por estímulos mecânicos em humanos (KLOSSNER et al., 2009).

3.2.3 Modelos de hipertrofia

Vários modelos animais são utilizados para induzir hipertrofia muscular rápida e extensa. Esses modelos permitem controle preciso dos parâmetros de exercício, carga e tipo de hipertrofia induzida (LOWE; ALWAY, 2002). Alguns modelos permitem a manipulação precisa dos tipos de contração (concêntrica, excêntrica e isométricas) para que as adaptações específicas possam ser estudadas detalhadamente (ADAMS et al., 2004; BAAR; ESSER, 1999).

Existem 4 modelos experimentais de indução de hipertrofia muscular esquelética: treinamento de força, estimulação elétrica, alongamento crônico e sobrecarga compensatória (ALWAY et al., 2005; LOWE; ALWAY, 2002; TIMSON, 1990).

3.2.3.1 *Treinamento de força*

O treinamento de força é realizado em animais condicionados a responder à estímulos como choque ou luz forte sendo recompensados com alimento após levantar o peso (ALWAY et al., 2005). Corrida contra uma resistência (ISHIHARA et al., 1998) e escalada (DUNCAN; WILLIAMS; LYNCH, 1998; HORNBERGER; FARRAR, 2004) em uma plataforma adaptada estimulam a hipertrofia muscular esquelética.

3.2.3.2 *Estimulação elétrica*

É um programa de treinamento de resistência com contrações involuntárias evocadas por estimulação elétrica resultando em hipertrofia muscular (LOWE; ALWAY, 2002). A eletroestimulação pode ser induzida diretamente na musculatura ou em um nervo adjacente, o que permite controle preciso da sobrecarga e tipos de contração (ALWAY et al., 2005). Alguns pesquisadores utilizam choque elétrico para promover elevação das cargas nos animais acordados, mas isso pode causar

estresse sistêmico com respostas hormonais que interferem no grau de hipertrofia do músculo esquelético (ALWAY et al., 2005).

3.2.3.3 Alongamento crônico

O alongamento crônico é adotado com sucesso para induzir adaptações hipertróficas nos músculos esqueléticos de várias espécies, incluindo aves, coelhos e ratos (ALWAY et al., 2005; LOWE; ALWAY, 2002). Adaptações musculares que ocorrem com o alongamento crônico incluem: hipertrofia, hiperplasia, aumento longitudinal do músculo e do comprimento miofibrilar e melhora do desempenho contrátil (ALWAY et al., 2005). Em coelhos e ratos, a sobrecarga por alongamento é atingida por imobilização ou engessamento do membro em uma posição que proporciona o máximo de alongamento do músculo (COX et al., 2000; GOLDSPINK et al., 1991). Massa de 10 - 12% do peso corporal de aves é normalmente ligado a uma asa e os músculos da asa contralateral são utilizados como controle (ALWAY et al., 2003; OUYANG; ALWAY, 2004). Este modelo unilateral proporciona uma vantagem em relação aos modelos bilaterais porque qualquer alteração sistêmica (por exemplo, hormonais), devido à manipulação experimental, é semelhante no controle e nos músculos submetidos ao alongamento crônico (ALWAY et al., 2005).

3.2.3.4 Sobrecarga compensatória

O modelo de sobrecarga compensatória é usado há décadas (BODINE; BAAR, 2012; GOLDBERG, 1968). Este modelo proporciona uma resposta hipertrófica satisfatória para análise em um curto período de tempo após a intervenção cirúrgica (ALWAY et al., 2005). A sobrecarga compensatória é alcançada por inativação da musculatura sinergista. O músculo remanescente é sobrecarregado durante a locomoção do animal (SAKUMA et al., 1998). Os músculos sinergistas são inativados por tenotomia, ablação ou desnervação.

Na tenotomia, o tendão distal dos músculos sinergistas é seccionado, causando sobrecarga no músculo remanescente sem afetar amplamente a mecânica de locomoção e volemia do animal. A tenotomia é utilizada para estudar a hipertrofia dos músculos plantar e sóleo (GOLDBERG, 1968; PEHME et al., 2004).

Na ablação sinergista realiza-se a remoção do músculo sinergista, mantendo-se no animal somente o músculo a ser estudado (ARMSTRONG et al., 1979; GUTH; YELLIN, 1971; JAMES, 1976). Por exemplo, a ablação dos músculos gastrocnêmio e sóleo sobrecarrega o músculo plantar (GUTH; YELLIN, 1971; JACKSON et al., 2012; ROY et al., 1982) ou a ablação do músculo tibial anterior promove sobrecarga sobre o músculo EDL (HAMILTON et al., 2010; JAMES, 1976).

A desnervação sinergista normalmente envolve secção dos ramos do nervo tibial que inerva os músculos gastrocnêmio medial e lateral e sóleo (ALWAY et al., 2005). As ramificações distais do nervo tibial são cortadas e suturadas a um músculo diferente para evitar a reinervação no tibial (BINKHORST, 1969; DEGENS; TUREK; BINKHORST, 1993). O músculo sóleo torna-se desnervado também porque o ramo do nervo tibial inerva outro que estimula o gastrocnêmio (BINKHORST, 1969). A pata contralateral serve como controle interno (ALWAY et al., 2005).

3.3 *Diabetes mellitus*

Segundo a Associação Americana de Diabetes, *diabetes mellitus* (DM) constitui um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica do DM está associada a danos a longo prazo, disfunção de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2013).

Diabetes mellitus do tipo 1 (DMT1) resulta da morte das células β do pâncreas por reação autoimune (ADA, 2013). Os marcadores de morte das células β incluem: anticorpos contra células β pancreáticas, insulina, GAD65 (*glutamate decarboxylase 65*), ZNT8 (*zinc transporter 8*) (WENZLAU et al., 2007) e anticorpos para tirosina fosfatases e IA-2 e IA-2 β (BINGLEY, 2010; YOON; JUN, 2005). A destruição de células β é mais acelerada em neonatos e crianças e menos em adultos (ADA, 2013).

Diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) ocorre em indivíduos que apresentam resistência à insulina e com deficiência na produção do hormônio. Esses indivíduos, em geral não precisam de tratamento com insulina (ADA, 2013).

Havia 171 milhões de pessoas diabéticas no mundo no início do século 21, e no Brasil eram 4,5 milhões (WILD et al., 2004). Acredita-se que em 2030 existam mais de 439 milhões de adultos (entre 20 e 79 anos) diabéticos no mundo (SHAW;

SICREE; ZIMMET, 2010). O DMT1 representa de 5 a 10% do total de casos. Já o DMT2 representa de 90 a 95% (ADA, 2013). Esses dados podem não ser corretos, pois estima-se que 5 a 15% dos pacientes diagnosticados com DMT2 apresentam na verdade DMT1 (ATKINSON, 2012; PALMER et al., 2005).

3.3.1 Diabetes induzido por estreptozotocina

O efeito diabetogênico da estreptozotocina foi relatado pela primeira vez em 1963 (LENZEN, 2007). Contudo o modelo de indução do DMT1 por estreptozotocina (STZ) começou a ser mais utilizado no final da década de 60 e início de 70 e vem sendo amplamente usado a partir de então (ARMSTRONG; IANUZZO, 1977; LIKE; ROSSINI, 1976; STEARNS; TEPPERMAN; TEPPERMAN, 1979). Vários autores estudaram o efeito do DMT1 induzido por estreptozotocina sobre o músculo esquelético e também no exercício físico (BARAZZONI et al., 2004; COPRAY et al., 2000; JOHNSTON et al., 2012; LJUBISAVLJEVIC; QURESHI; NAGELKERKE, 2010; UNGVARI et al., 1999). Após a administração de estreptozotocina ocorre a completa perda de integridade das células β do pâncreas em um período de 12 a 48 horas (LENZEN, 2007). A excreção total da estreptozotocina se dá no máximo após 48 horas após a injeção (KARUNANAYAKE; HEARSE; MELLOWS, 1974, 1975, 1976). Este fato evita efeitos colaterais a longo prazo da administração da droga.

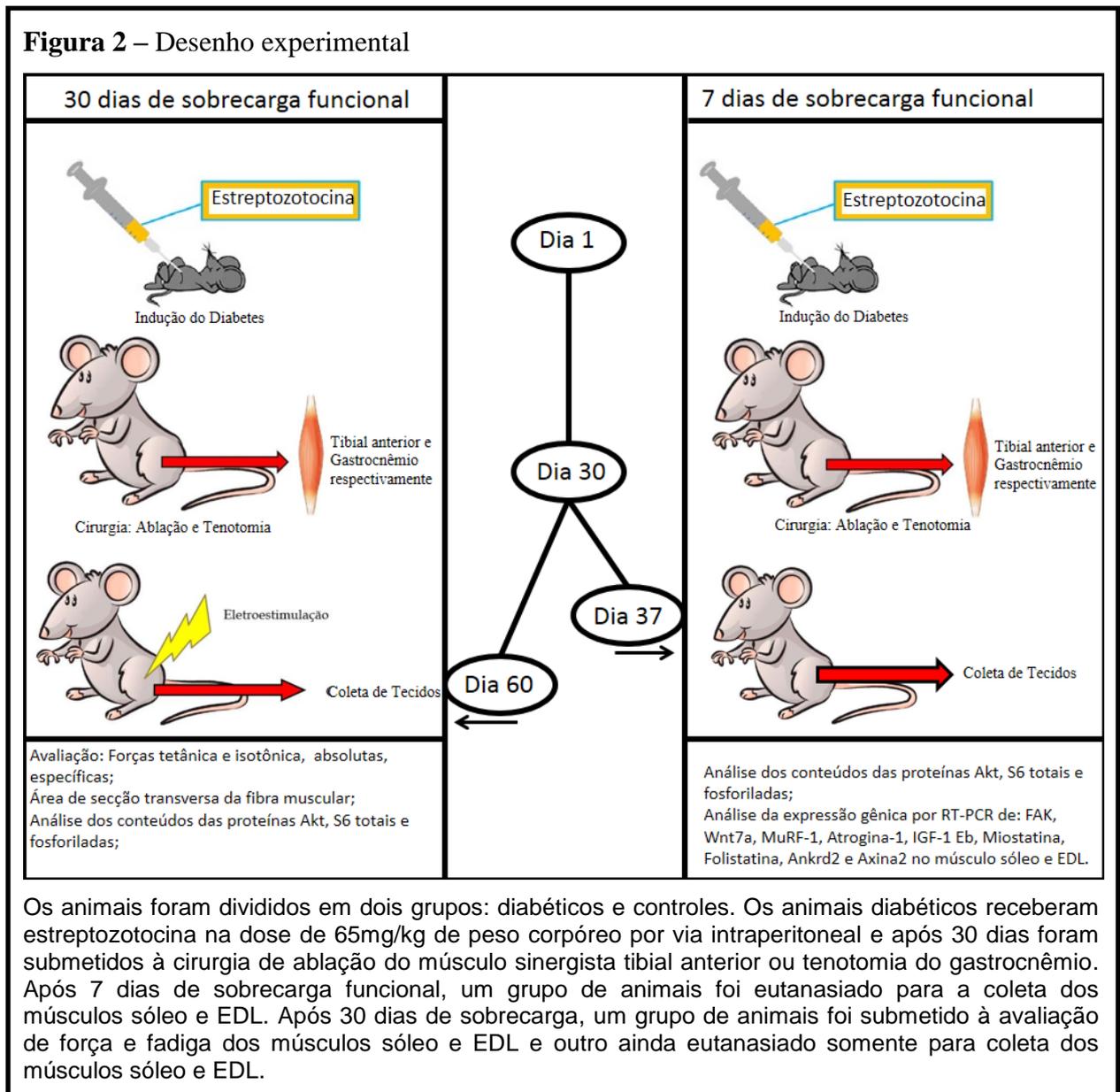
A estreptozotocina é extraída do micro organismo *Streptomyces achromogenes*, um análogo da glicose sendo transportada para o interior das células β pelo GLUT4 (*Glucose transporter 4*). Causa morte das células por produzir de quantidade excessiva de espécies reativas de oxigênio e alquilação do DNA (LENZEN, 2008). A biossíntese de insulina, a secreção induzida pela glicose e o metabolismo desta são afetados pela administração de estreptozotocina (LENZEN, 2007, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos, com 3 semanas de idade, da linhagem Wistar, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº 011 nas fls. 124 do livro 2).

4.2 Desenho experimental



4.3 Indução ao *diabetes mellitus*

Para indução de *diabetes mellitus*, os animais receberam uma única injeção endovenosa (caudal) de estreptozotocina (65mg/kg de peso corpóreo, i.p.) dissolvida em tampão citrato, pH 4,2. Animais controles receberam volume equivalente de tampão citrato pela mesma via. Os experimentos foram realizados quatro semanas após a injeção da droga diabetogênica. A glicemia foi determinada por meio de um dosador de glicose (Roche Diagnostics Corporation, IN, EUA), utilizando-se amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais. Foram utilizados somente animais com glicemia superior a 400 mg/dL.

4.4 Cirurgia de ablação sinergista e tenotomia

Na tenotomia no gastrocnêmio, uma incisão longitudinal foi feita na pata traseira esquerda sob anestesia (cetamina e xilazina, 200mg/kg e 100 mg/kg de peso corpóreo, por via i.p., respectivamente), expondo o músculo a ser removido. Os tendões proximal e distal foram então isolados para a excisão do distal sem comprometer o nervo, suprimento de sangue e os outros músculos. O músculo gastrocnêmio não foi removido para não afetar a volemia, massa corporal total e função da pata a ser analisada. Na tenotomia do gastrocnêmio, o tendão distal foi isolado após a fáscia muscular ter sido removida e o tendão seccionado. A pele foi então suturada e o corte coberto com solução contendo iodo (povidine) para prevenir contaminação. Na pata direita foi realizada a simulação (*sham*) do procedimento cirúrgico (BODINE; BAAR, 2012; GUTH; YELLIN, 1971; JAMES, 1976; ROY *et al.*, 1982).

Na ablação do tibial anterior, os mesmos procedimentos operacionais foram aplicados, exceto que a incisão foi realizada na porção anterior da pata traseira esquerda expondo o músculo tibial anterior. Simulação (*sham*) do procedimento cirúrgico foi realizada na pata direita (ARMSTRONG *et al.*, 1979; BALDWIN *et al.*, 1982; BODINE; BAAR, 2012; DEGENS; TUREK; BINKHORST, 1993)

4.5 Análise gravimétrica do músculo esquelético

Os músculos retirados em 7 e 30 dias após a indução da hipertrofia tiveram o peso úmido determinado em balança de precisão. Em seguida, foram colocados em estufa, durante 72 horas a 37 °C, para evaporação do conteúdo total de água. Após esse período, determinou-se o peso seco.

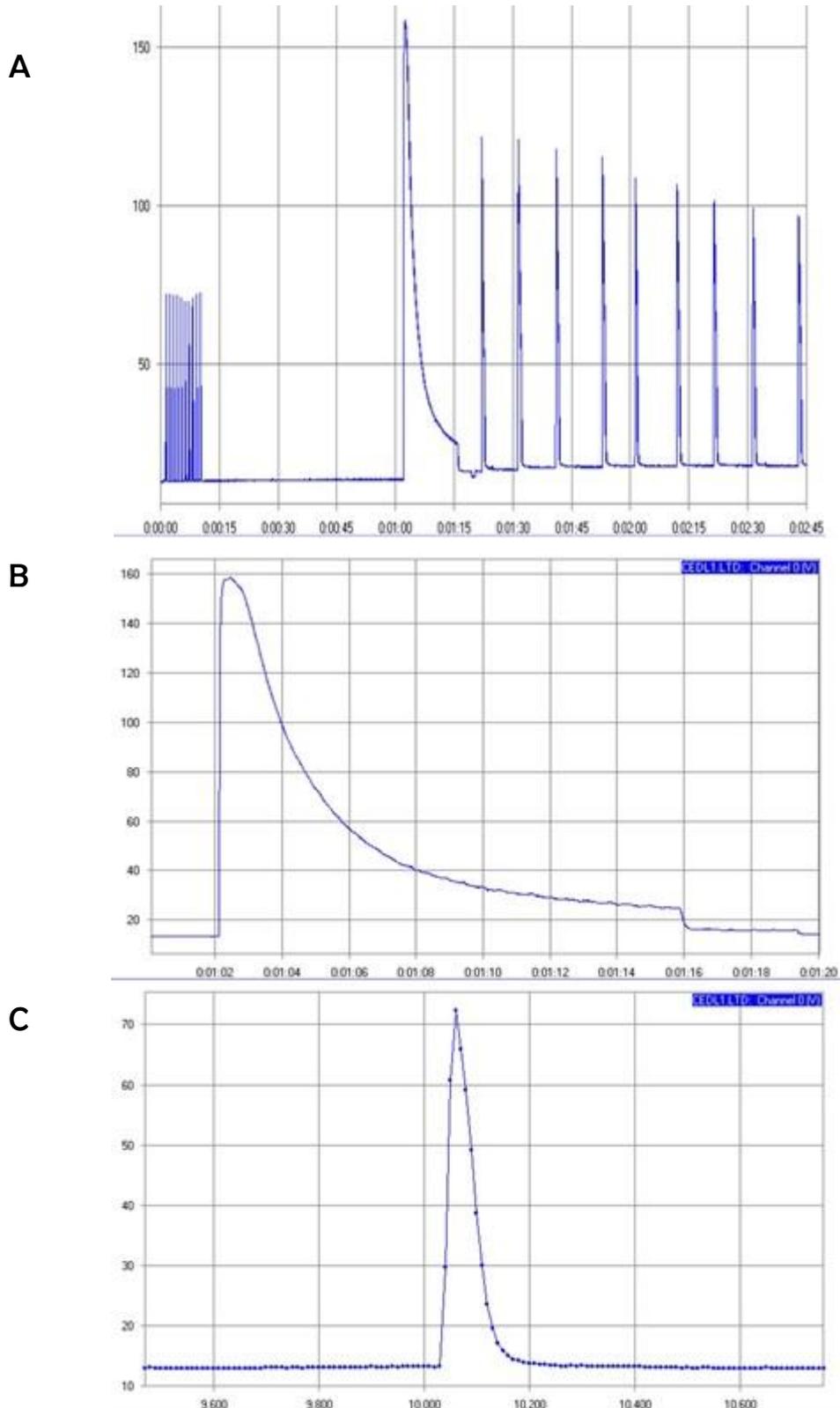
4.6 Teste de força muscular e resistência à fadiga

Após 30 dias, os animais foram submetidos ao teste de função muscular (PINHEIRO et al., 2011, 2012; PINHEIRO; VITZEL; CURI, 2012). Para isso os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (200 e 100 mg/kg de peso corpóreo por via i.p., respectivamente) e a pele da pata removida. Uma incisão foi realizada na região proximal e lateral da coxa. Em seguida, o nervo ciático foi localizado e um eletrodo de platina foi acoplado a este.

A articulação do joelho foi estabilizada mecanicamente por uma haste metálica fixada no quadríceps do animal e preso à placa de acrílico (Figura 4). O tendão calcâneo foi conectado a uma haste metálica acoplada a um transdutor de força isométrica (Grass Technologies, West Warwick, Rhode Island, EUA).

Contrações intensas foram induzidas por eletroestimulação a 100 Hz com duração de pulso de 0,5 ms, utilizando o MultiStim System D330 (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido). Nessa condição ocorre somação temporal total e tétano. Previamente, a amplitude máxima dos abalos musculares foi determinada por ajuste do comprimento muscular ideal dado por tração mecânica e pela voltagem máxima capaz de gerar aumento constante na força de contração (por volta de 10 a 12 volts). Os dados foram captados pelo transdutor e enviados a um computador. A aquisição dos dados foi feita com o auxílio do *software* AqDados (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, Brasil). A força isotônica máxima desenvolvida foi determinada pela amplitude dos abalos musculares obtidos com frequência de estimulação de 1Hz. Nessa condição não ocorre somação temporal e tétano. A resistência à fadiga foi avaliada pela queda da força ao longo de 10 contrações tetânicas máximas sucessivas (Figura 3).

Figura 3 – Miogramas representativos dos experimentos realizados



(A) Miograma obtido após eletroestimulação. (B) Força tetânica máxima produzida a 100 Hz. (C) Força isotônica máxima produzida a 1 Hz.

Os dados foram analisados com o auxílio dos *softwares* AqAnalysis (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda) e Microcal Origin™ (Microcal Software, Inc.). O pico da curva do miograma foi utilizado para se determinar a força exercida. Os testes permitem avaliar também a força absoluta que é a quantidade total de força exercida pelo músculo. A força específica, determinada pela razão entre a força absoluta e a massa seca do músculo. Esta última pode também ser expressa em relação à área da secção transversa (CSA) do músculo avaliado. Após o teste, os animais foram eutanasiados por decapitação.

4.7 Análise histológica dos músculos sóleo e EDL

A preparação das lâminas foi realizada com cortes seriados de 10 µm de espessura dos músculos EDL e sóleo. Os músculos foram fixados com paraformaldeído a 10% e emblocados em parafina. Os cortes foram realizados na região medial e transversalmente ao músculo. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina para análise do diâmetro das fibras (PINHEIRO *et al.*, 2011). Foram analisadas 120 fibras musculares adjacentes por animal, totalizando 740 de 6 animais. As quantificações das análises foram realizadas em microscópio óptico (Nikon DXM1200, Japão), objetivas com 10X de aumento, acoplado a uma câmera. As imagens digitalizadas foram analisadas usando o programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

4.8 Western blotting

Os músculos EDL e sóleo foram retirados 7 e 30 dias após a indução da hipertrofia e homogeneizados em solução tampão (1% SDS, 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 100 mM de ortovanadato de sódio e 250 mM de cloreto de sódio) para extração de proteínas. O homogeneizado foi incubado à 4 °C, por 10 minutos, e, em seguida, centrifugado à 10.000 g, por 10 minutos, para remoção dos fragmentos teciduais. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação das proteínas totais por espectrofotometria pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) (Biorad, Contra Costa, CA, EUA). O restante do sobrenadante foi diluído em tampão Laemmli (1:5 v/v) contendo ditiotreitol a 100 mM e submetido à incubação por 10 minutos à 96°C.

Após essa etapa, o material foi congelado à -80 °C para posterior separação eletroforética das proteínas que foi realizada em géis de poliacrilamida a 6 e 12% (%T) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad).

As membranas foram bloqueadas com solução de BSA a 5% (ou leite desnatado em pó) por 2 horas em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra as proteínas Akt, S6 total e Akt Thr³⁰⁸ e S6 Ser^{244/240} fosforiladas por uma noite à 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário associado à peroxidase (Amershan Pharmacia, UK) e reagentes de detecção do kit ECL de quimiluminescência (Amershan Pharmacia, UK). As membranas foram expostas durante períodos de tempos variados a filmes de raios-X que depois foram revelados. Por fim, as bandas contendo as proteínas estudadas foram quantificadas por meio da análise de densitometria óptica utilizando o *software* de domínio público Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e normalizadas pelo controle interno de proteína da amostra (utilizando o corante Ponceau). As proteínas normalmente utilizadas como controle constitutivo sofrem variação na sua expressão neste modelo experimental (FERGUSON *et al.*, 2005). Procedimento similar foi utilizado em estudos anteriores do grupo (PINHEIRO *et al.*, 2010, 2011).

4.9 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR

O RNA total dos músculos sóleo e EDL foi extraído utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada por densidade óptica no comprimento de onda de 260 nm (cada unidade de leitura corresponde a 40 µg/mL de RNA), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). Foram utilizados 2 µg de RNA para transcrição reversa e síntese do cDNA, utilizando *primers* oligo-dT e o kit de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada na ordem: 70 °C por 10 minutos, 37 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos. Para amplificação das seqüências de interesse do cDNA, foram usados 2 µL de cDNA, 5 µL de SYBR Green (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µL (10 µM) de

cada primer *sense* e *anti-sense* do gene-alvo (Tabela 1) e 1 µL de água Milli-Q autoclavada. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) foi realizada com as seguintes etapas: 50 °C por 2 minutos (ativação da enzima), 95 °C por 10 minutos (desnaturação) e 45 ciclos de três fases – a primeira a 95 °C por 20 segundos (desnaturação), a segunda a 58 °C por 30 segundos (anelamento) e a terceira a 72 °C por 30 segundos (extensão). A análise da fluorescência proporcionada pelo SYBR Green, conforme amplificação específica da sequência de interesse, foi realizada no detector Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). O *cycle threshold* (CT), ciclo no qual a sequência de interesse já foi amplificada o suficiente para gerar fluorescência distinguível daquela de fundo foi avaliado em triplicata para cada amostra. A subtração do CT do gene de interesse do CT do gene de referência ou *housekeeping* da como resultado a variação de CT (Δ CT). As amostras avaliadas foram normalizadas pela média de Δ CT dos animais controle (Δ CT amostra – média Δ CT controle), obtendo-se o valor de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT}. O gene de referência utilizado foi o *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1).

Tabela 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR

	Primer Sense (forward)	Primer Antisense (forward)
FAK	5'-AAGGAGCACCTCTCAAACCG-3'	5'-CATCGCTCCGACAGCATTTG-3'
Wnt 7a	5'-GCGCTCTAGGACAGTCTCCA-3'	5'-GGGGCAATCCACATAGCCTG-3'
MuRF-1	5'-GGACCGGCATGGGGTGTACG-3'	5'-TTTCTGCAGGGGCCGACTGG-3'
Atrogina-1	5'-CGGCACCTTCGTGAGCGACC-3'	5'-GTGCAGTATCCATGGCGCTCCT-3'
IGF-1 Eb (MGF)	5'-GCTTGCTCACCTTTACCAGC-3'	5'-AAGTGACTTCCTTTCTTCTC-3'
Miostatina	5'-TACCACGGAAACAATCATTACCAT-3'	5'-TGCCATCCGCTTGCATT-3'
Folistatina	5'-AGCGAGTGTGCCATGAAG-3'	5'-GAGTGGAAGAGATAGGGAAGC-3'
Ankrd2	5'-TGATGCCGTGAGACTCAACC-3'	5'-TTAGCCATCATGTCTGCCCC-3'
Axina 2	5'-CTCAGCAAAAAGGGAAATTACAGGTAT-3'	5'-ACTGTCTCGTGTCCAGATCTC-3'
HPRT1	5'-GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT-3'	5'-GCCACATCAACAGGACTCTGTAG-3'

Abreviaturas: FAK – *Focal adhesion kinase*; Wnt 7a – *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*; MuRF-1 – *Muscle RING-finger protein-1*; IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1 Eb-peptide*; Ankrd2 – *Ankyrin repeat domain 2*; HPRT1 – *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*.

4.10 Análise estatística

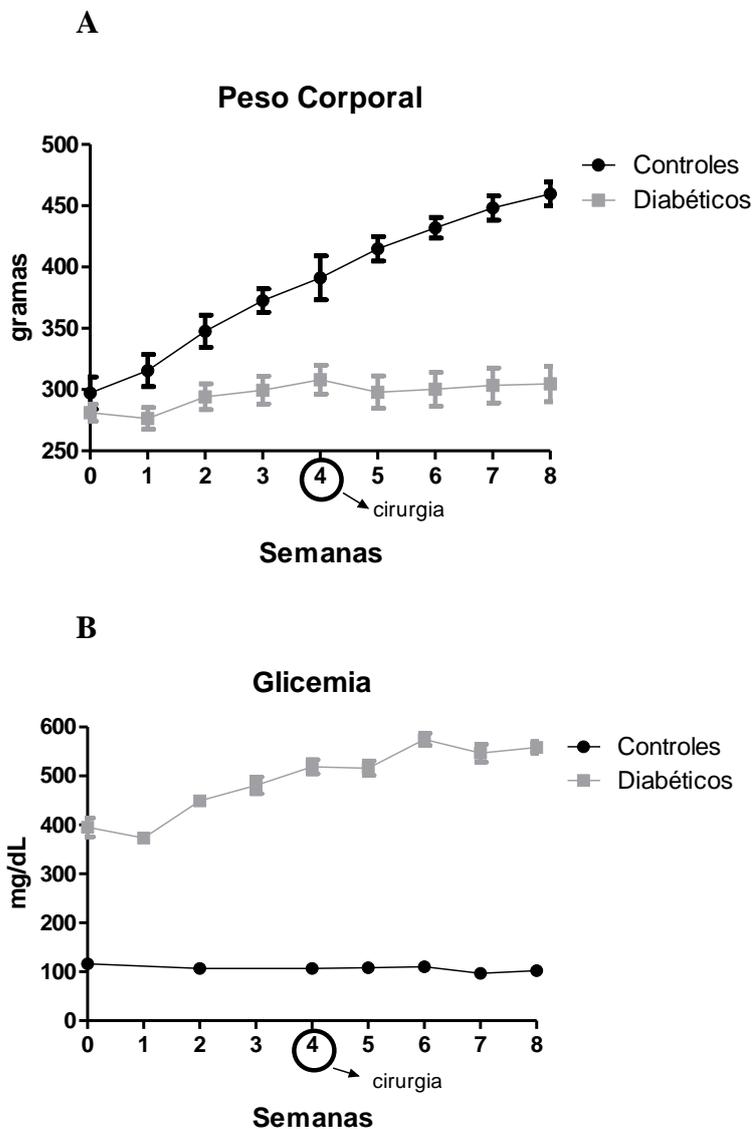
Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste “*t*” de *Student* não pareado para comparação entre dois grupos ou por análise de variância (ANOVA *two-way*) seguida pelo pós-teste de Bonferroni, para comparação entre três ou mais grupos. As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$. Para a avaliação da área de secção transversa (CSA) dos músculos, utilizou-se inicialmente o teste de normalidade de Anderson–Darling. Como os dados não se distribuíram normalmente, foi utilizado o intervalo de confiança de 95% da mediana. As diferenças foram consideradas significativas quando não foi encontrada sobreposição entre o intervalo de confiança de 95% da média (PINHEIRO *et al.*, 2011).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do estado diabético

O peso corporal dos animais controles aumentou exponencialmente (54%) enquanto nos animais diabéticos permaneceu quase inalterado (aumento de 8%) em 8 semanas (Figura 4A e Quadro A1). A glicemia permaneceu inalterada nos controles enquanto nos diabéticos aumentou em 54% nas 8 semanas (Figura 4B e Quadro A2), confirmando o estabelecimento do estado hiperglicêmico.

Figura 4 – Peso corporal e glicemia dos animais durante 8 semanas



(A) Evolução ponderal e (B) glicêmica dos animais controles e diabéticos ao longo de 8 semanas. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de no mínimo 8 animais.

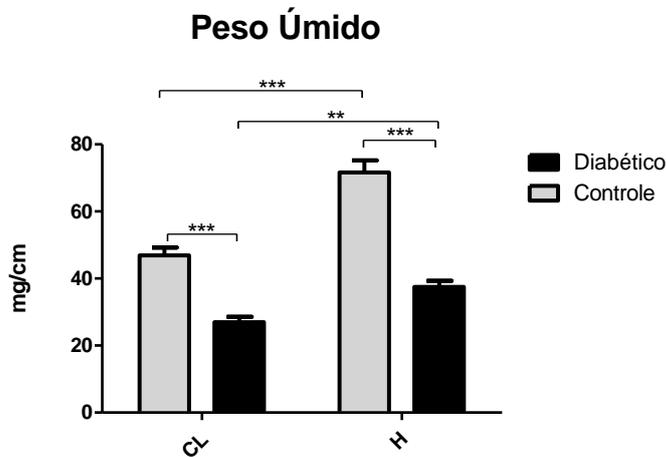
Os consumos diários alimentar e hídrico dos animais diabéticos foram mais elevados em relação aos controlos conforme esperado. Após a cirurgia, os consumos de alimento e água não se alteraram (dados não mostrados).

5.2 Análise gravimétrica dos músculos EDL e sóleo

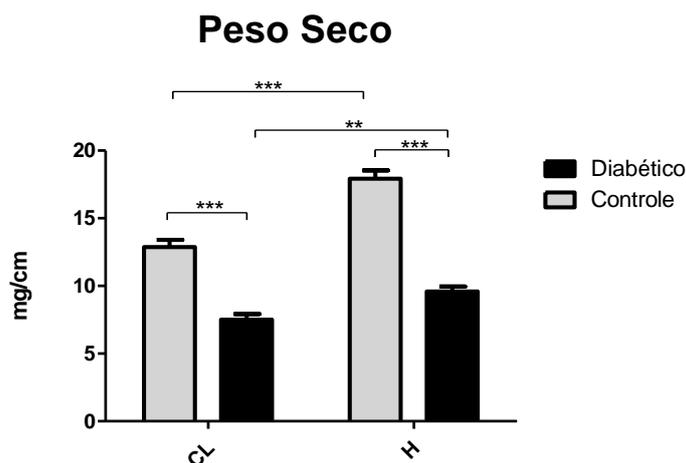
Após 4 semanas de sobrecarga funcional por ablação do músculo tibial anterior, observou-se resposta hipertrófica significativa no músculo EDL; aumento de 39,4% do peso úmido nos animais diabéticos e de 52,9% nos controlos (Figura 5A e Quadro A3). A hipertrofia foi semelhante nos animais diabéticos e controlos e quando eliminado o conteúdo total de água, o aumento foi de quase 50% do peso seco do músculo em ambos os grupos (Figuras 5B e 5C e Quadro A3). Os valores de pesos úmido e seco foram normalizados pelo comprimento da tibia.

Figura 5 – Pesos úmido e seco e razão de aumento (peso hipertrofiado/peso contralateral) na hipertrofia após 30 dias de sobrecarga do músculo EDL

A



B



C

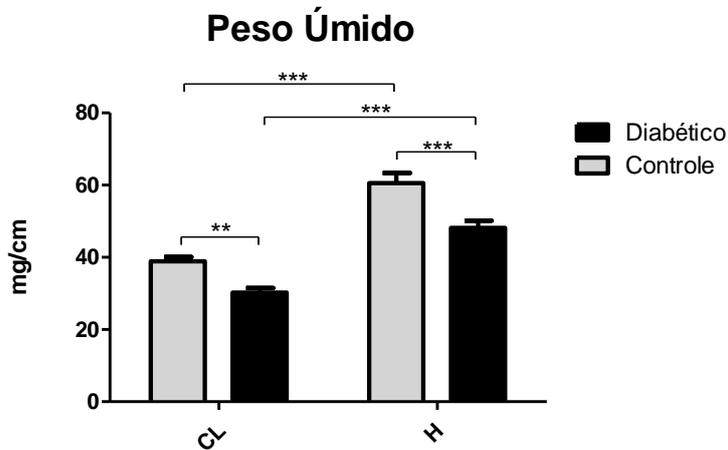


(A) Peso úmido do músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional, normalizado pelo comprimento da tíbia. (B) Peso seco do músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional, normalizado pelo comprimento da tíbia. (C) Razão de aumento do peso seco (peso do músculo hipertrofiado/peso do músculo contralateral). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de no mínimo 7 animais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, pelo teste ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada.

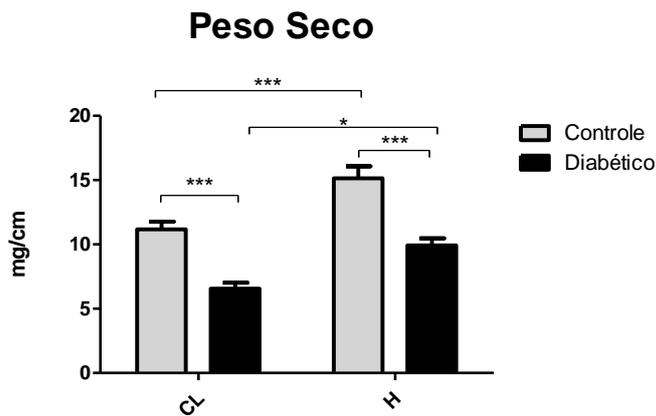
Após 4 semanas de sobrecarga funcional por meio da tenotomia do músculo gastrocnêmio, o músculo sóleo apresentou resposta hipertrófica significativa. A hipertrofia do músculo sóleo foi semelhante nos animais diabéticos e controles (aumento de 59% em ambos), mostrando aumento de 50%, quando analisados o peso seco do músculo (Figura 6 e Quadro A4).

Figura 6 – Peso úmido, seco e razão de aumento (peso hipertrofiado/peso contralateral) na hipertrofia após 30 dias de sobrecarga do músculo sóleo

A



B



C

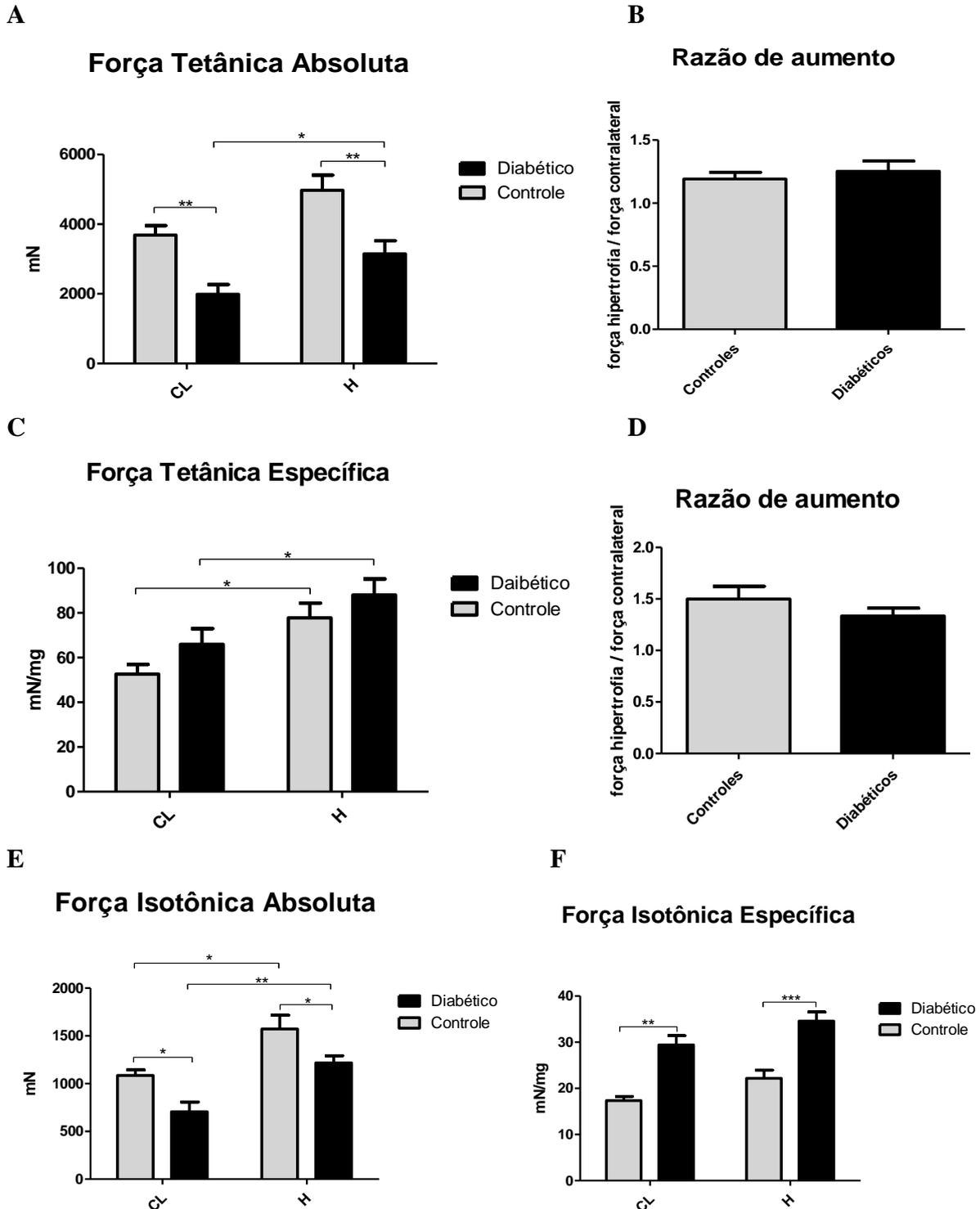


(A) Peso úmido do músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional, normalizado pelo comprimento da tibia. (B) Peso seco do músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional, normalizado pelo comprimento da tibia. (C) Razão de aumento do peso seco (peso do músculo hipertrofiado/peso do músculo contralateral). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de no mínimo 5 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, pelo teste ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada.

5.3 Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas no músculo EDL

As forças tetânica absoluta e relativa do músculo EDL hipertrofiado foram diferentes entre animais diabéticos e controles. A força tetânica absoluta aumentou em 74% nos animais controle e diabéticos (Figura 7A e Quadro A5). A hipertrofia causou efeito significativo sobre a força específica, normalizada pelo peso seco do músculo; aumento de 67% nos animais controles e de 78% nos (Figura 7C e Quadro A5). O aumento da força específica do músculo hipertrofiado em relação ao contralateral não foi diferente entre os grupos. O grupo diabético apresentou força isotônica específica dos músculos EDL mais elevada (em 22,6% e 11,6% respectivamente) quando comparada ao controle (Figuras 9E e 9F e Quadro A5).

Figura 7 – Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas e suas respectivas razões de aumento (força hipertrofia/força contralateral) do músculo EDL

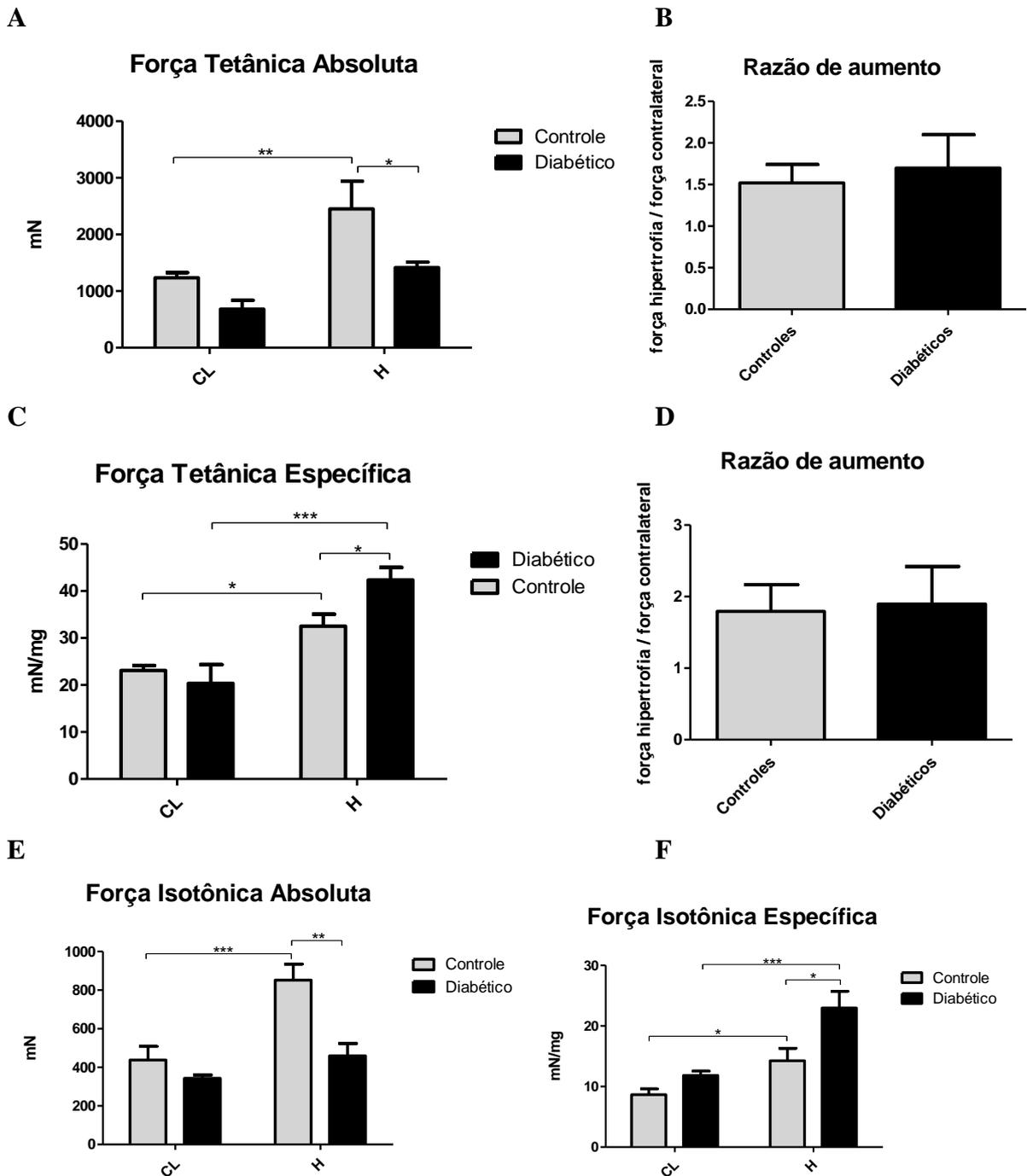


(A) Força tetânica absoluta do músculo EDL após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (B) Razão de aumento na força (força hipertrofiado/força contralateral). (C) Força específica calculada pela razão entre força absoluta e o peso seco do músculo EDL após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (D) Razão de aumento na força (força hipertrofiado/força contralateral). (E) Força isotônica absoluta do músculo EDL após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (F) Força isotônica específica calculada pela razão entre força absoluta e o peso seco do músculo EDL após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 6 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada.

5.4 Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas no músculo sóleo

A força tetânica absoluta aumentou em 98% nos animais controle e em 107% nos animais diabéticos em função da hipertrofia (Figura 8A e Quadro A6). A força específica, normalizada pelo peso seco do músculo sóleo, apresentou diferença significativa; aumentou 39% nos animais controles e em 110% nos diabéticos (Figura 8C e Quadro A6). O grupo diabético apresentou força isotônica relativa mais elevada quando comparado ao controle em 37% na pata contralateral e 60% na pata hipertrofiada do músculo sóleo (Figuras 8E e 8F e Quadro A6). A pata contralateral dos animais diabéticos não apresentou força específica mais elevada do que os controles.

Figura 8 – Análise das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas e suas respectivas razões de aumento (força hipertrofia/força contralateral) do músculo sóleo



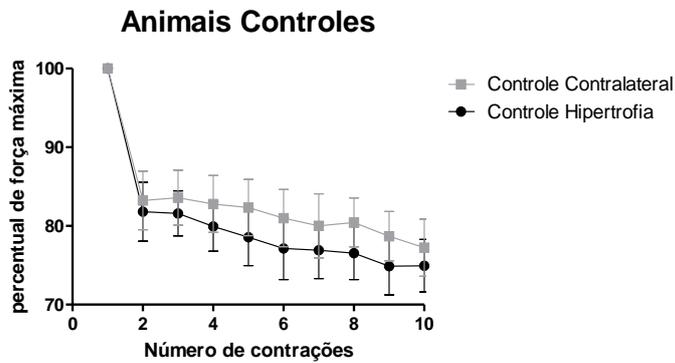
(A) Força absoluta do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (B) Razão de aumento na força, força final/força inicial. (C) Força específica calculada pela razão entre força absoluta e o peso do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (D) Razão de aumento na força, força final/força inicial. (E) Força isotônica absoluta do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (F) Força isotônica específica calculada pela razão entre força absoluta e o peso seco do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 5 animais. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada.

5.5 Resistência à fadiga

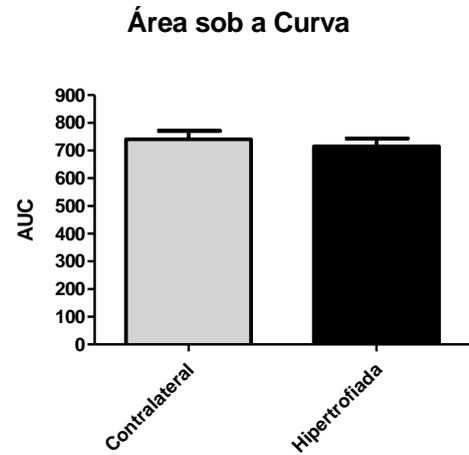
Os dados de resistência à fadiga estão apresentados como as diferenças entre músculos hipertrofiado e contralateral do mesmo grupo, mostrando o efeito da hipertrofia e as diferenças entre os grupos controle e diabético (Figura 9 e Quadro A7). A resistência à fadiga foi avaliada pelo decaimento da força tetânica por dez contrações máximas consecutivas. Observou-se que o músculo EDL da pata hipertrofiada nos animais diabéticos resiste mais à fadiga quando comparado ao dos animais controles. Não foi encontrada diferença significativa na resistência à fadiga na pata contralateral (Figura 10 e Quadro A8).

Figura 9 – Efeito da sobrecarga funcional por 30 dias sobre a resistência à fadiga do músculo EDL nos animais controles e diabéticos

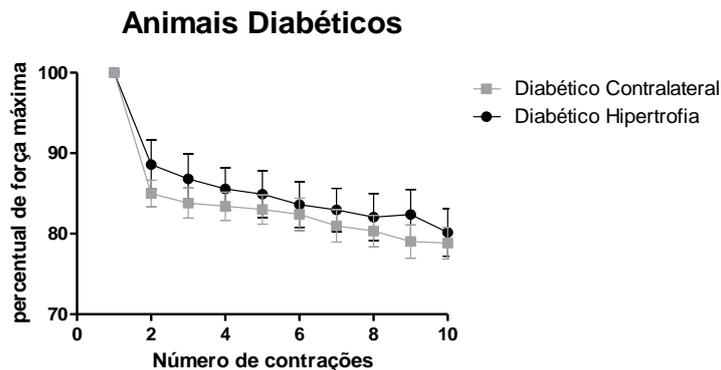
A



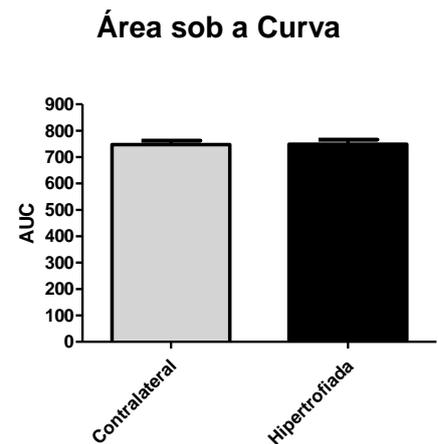
B



C

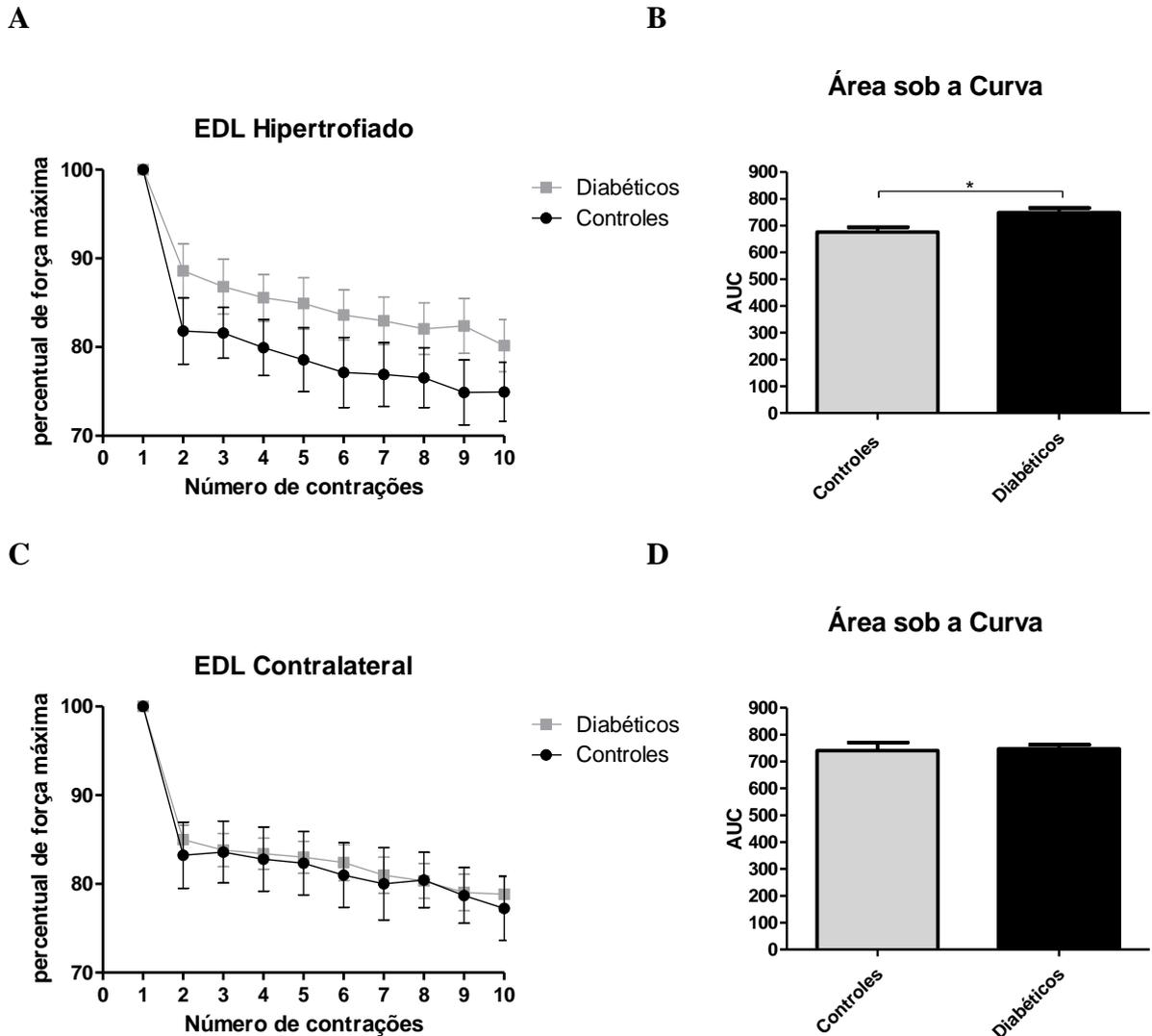


D



(A) Resistência do músculo EDL à fadiga após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias comparado com aquele não submetido à sobrecarga funcional dos animais controle. (B) Área sob a curva da resistência à fadiga dos músculos EDL hipertrofiado e contralateral. (C) Resistência do músculo EDL à fadiga após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias comparado com aquele não submetido à sobrecarga funcional dos animais diabéticos. (D) Área sob a curva da resistência à fadiga dos músculos EDL hipertrofiado e contralateral. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 6 animais. Não houve significância para $P < 0,05$.

Figura 10 – Comparação entre os animais controle e diabéticos na resistência à fadiga do músculo **EDL** após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias

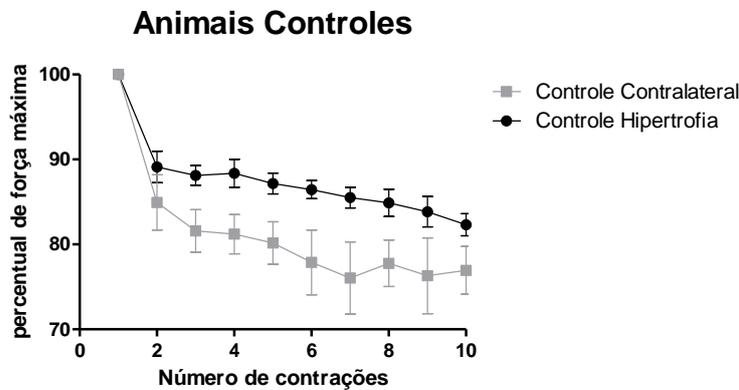


(A) Resistência à fadiga do músculo EDL após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (B) Área sob a curva da resistência à fadiga do músculo EDL hipertrofiado. (C) Resistência à fadiga do músculo EDL da pata contralateral sem sofrer sobrecarga funcional. (D) Área sob a curva da resistência à fadiga do músculo EDL da pata contralateral. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 6 animais. * $P < 0,05$, pelo teste “*t*” de Student.

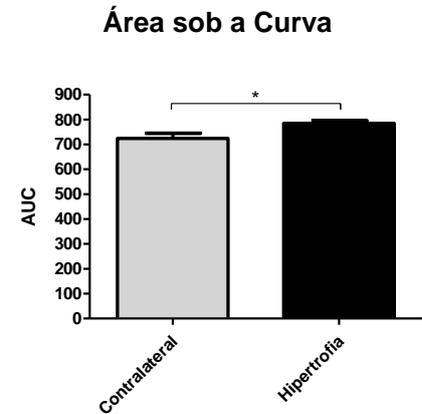
O músculo sóleo da pata hipertrofiada resistiu mais à fadiga do que aquele da contralateral no grupo controle (Figura 11A e Quadro A9). O músculo sóleo da pata hipertrofiada dos animais diabéticos resistiu menos à fadiga do que o da contralateral (Figura 11C e Quadro A9). Não houve diferença na resistência à fadiga no músculo sóleo da pata contralateral (Figura 12C e Quadro A10). Nos animais controles, nota-se maior resistência à fadiga no músculo sóleo hipertrofiado comparado com o contralateral (Figura 12A e Quadro A10).

Figura 11 – Efeito da sobrecarga funcional por 30 dias na resistência à fadiga do músculo **sóleo** nos animais controles e diabéticos

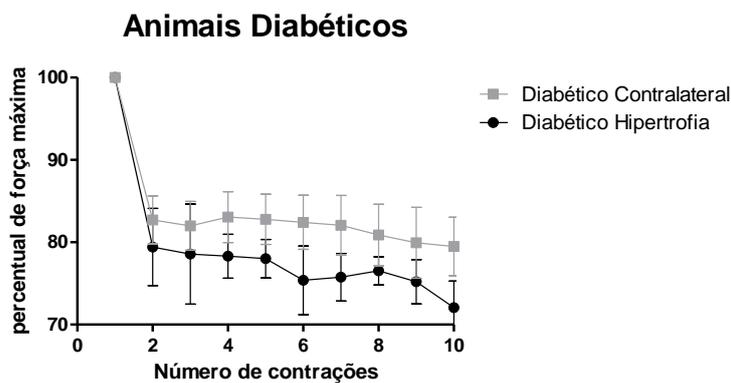
A



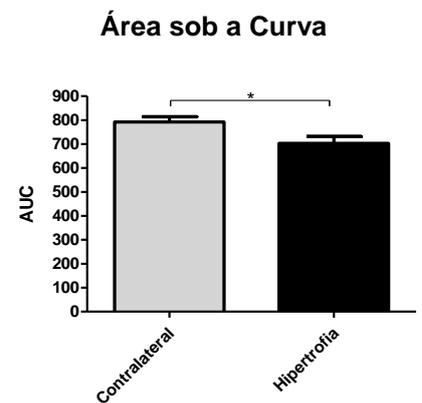
B



C



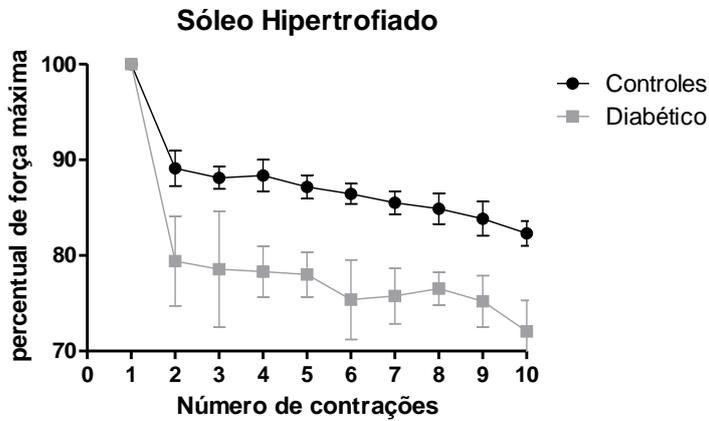
D



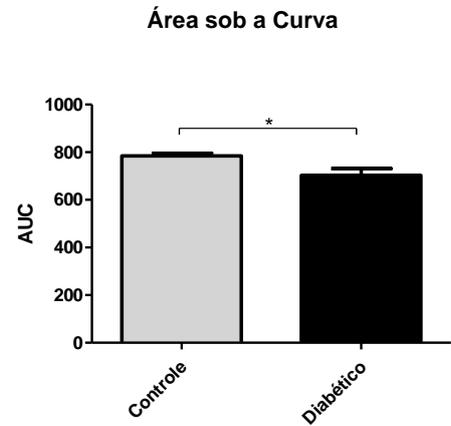
(A) Resistência à fadiga do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias comparado com o músculo sóleo não submetido à sobrecarga funcional dos animais controle. (B) Área sob a curva da resistência à fadiga dos músculos sóleos hipertrofiado e contralateral. (C) Resistência à fadiga do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias comparado com aquele não submetido à sobrecarga funcional dos animais diabéticos. (D) Área sob a curva da resistência à fadiga dos músculos sóleos hipertrofiado e contralateral. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 4 animais. * $P < 0,05$, pelo teste “*t*” de Student.

Figura 12 – Comparação entre os animais controles e diabéticos na resistência à fadiga do músculo **sóleo** após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias

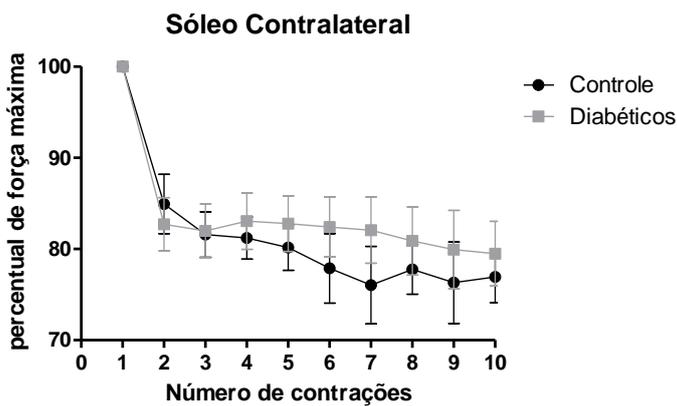
A



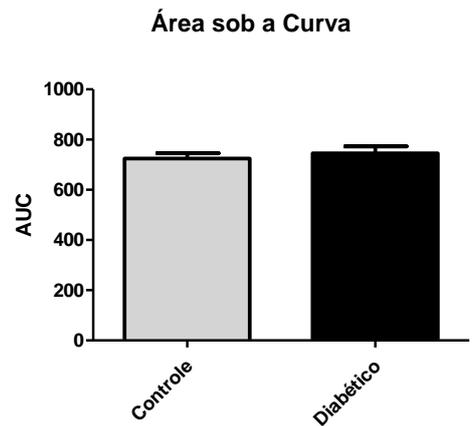
B



C



D



(A) Resistência à fadiga do músculo sóleo após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias. (B) Área sob a curva da resistência à fadiga do músculo sóleo hipertrofiado. (C) Resistência à fadiga do músculo sóleo da pata contralateral sem sofrer sobrecarga funcional. (D) Área sob a curva da resistência à fadiga do músculo sóleo da pata contralateral. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 4 animais. * $P < 0,05$, pelo teste “*t*” de Student.

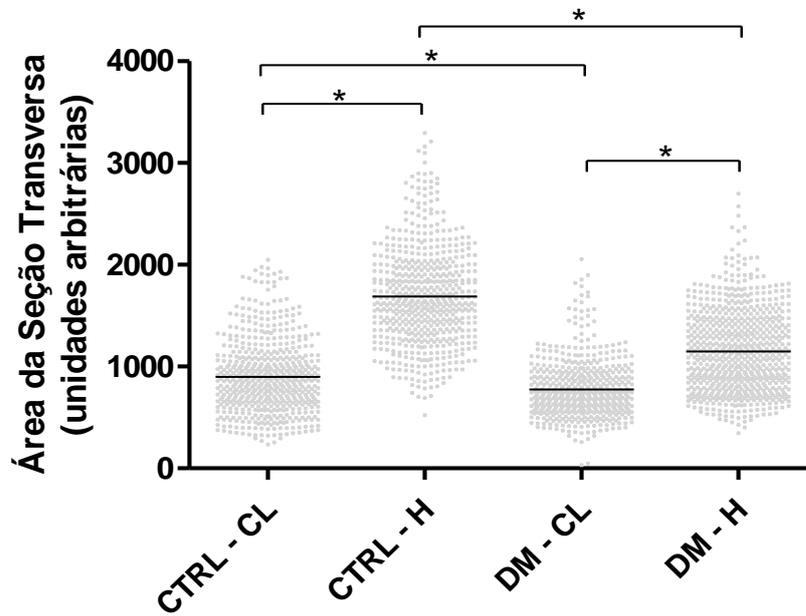
5.6 Área da secção transversa da fibra muscular (CSA)

A área da secção transversa dos músculos sóleo e EDL nos animais diabéticos e controles aumentou significativamente após 4 semanas de sobrecarga funcional. No músculo EDL, no grupo controle, houve aumento de 79% e nos animais diabéticos 34% (Figura 13A). No músculo sóleo, houve aumento de 23% no grupo controle e de 45% nos animais diabéticos (Figura 13B). Estes dados estão de acordo com aqueles dos pesos úmido e seco.

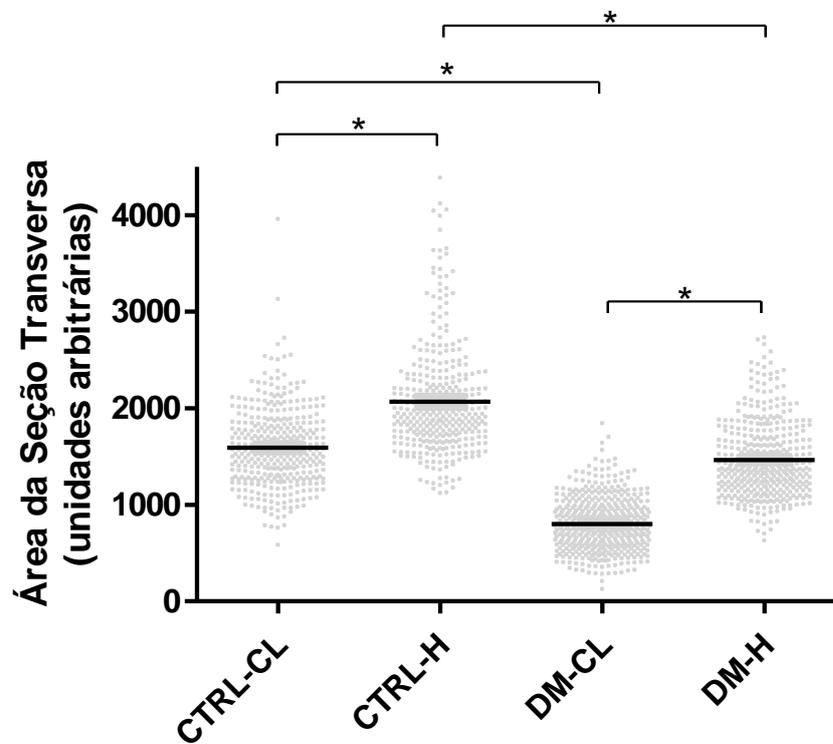
Houve diferença entre os músculos sóleo e EDL dos animais controles e diabéticos mesmo na ausência do estímulo hipertrófico. O músculo EDL da pata contralateral do grupo diabético foi 13% menor que no controle e da pata hipertrofiada foi 32% menor (Figura 13A). A CSA do músculo sóleo da pata contralateral do grupo diabético foi 49% menor que aquela do controle e da pata hipertrofiada foi 29% (Figura 13B).

Figura 13 – Área da secção transversa dos músculos EDL (A) e sóleo (B)

A



B



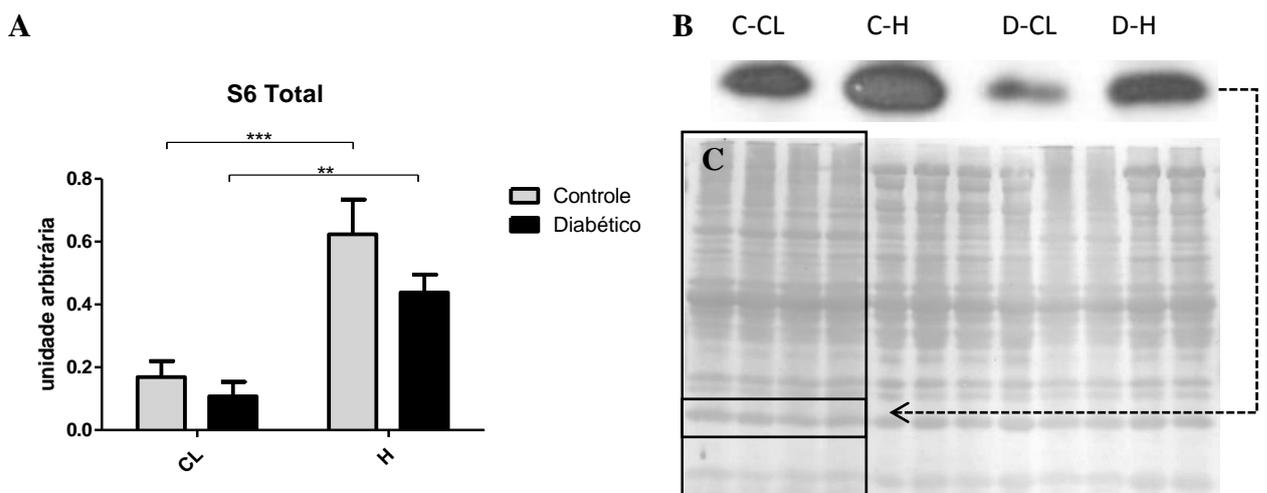
(A) Área da seção transversa do músculo EDL (B) Área da seção transversa do músculo sóleo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. CTRL-CL = Grupo controle, pata contralateral, CTRL-H = Grupo controle, pata hipertrofiada, DM-CL = Grupo Diabético, pata contralateral, DM-H = Grupo diabético, pata hipertrofiada.

5.7 Conteúdos das proteínas S6 e Akt, totais e fosforiladas, no músculo EDL

O efeito de 4 semanas de sobrecarga funcional sobre o conteúdo das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas foi avaliado no músculo EDL em animais submetidos ao estado diabético por 8 semanas. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo total de proteínas conforme corado com Ponceau.

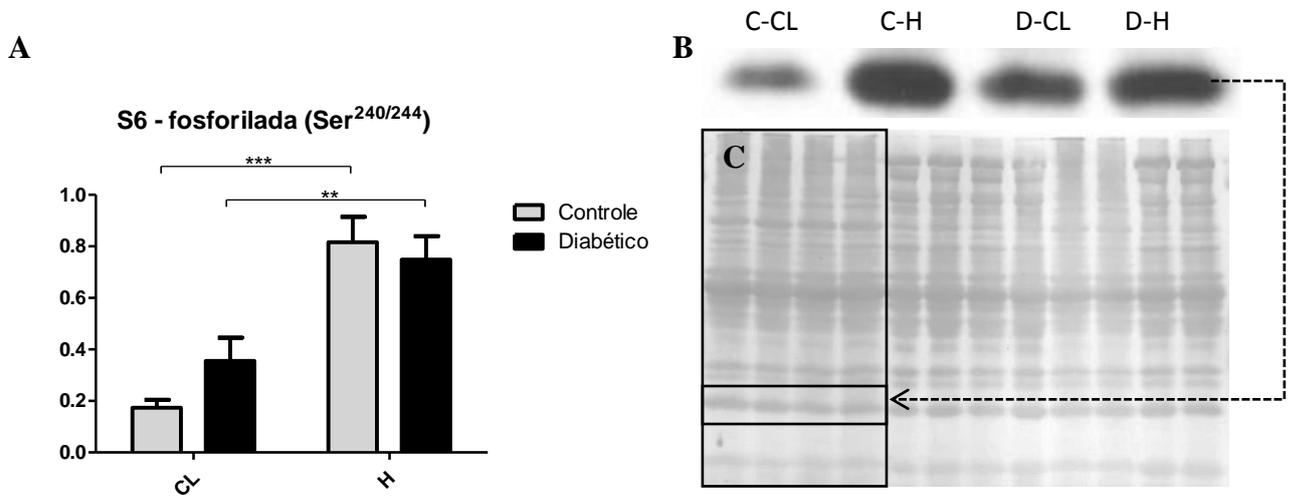
O conteúdo de Akt total não se alterou no músculo EDL em 7 dias de sobrecarga (Figura 16 e Quadro A13). Entretanto, ocorreu aumento da fosfo-Akt (Thr308) em 2,1 vezes no controle e de 1,5 vezes nos diabéticos após 7 dias de sobrecarga (Figura 17 e Quadro A14). Após este mesmo período de sobrecarga no músculo EDL, o conteúdo de S6 total aumentou em 3,6 e 4 vezes (Figura 14 e Quadro A11), nos grupos controle e diabético, respectivamente. Os conteúdos de fosfo-S6 aumentaram em 4,7 vezes no grupo controle e de 2,1 vezes no grupo diabético (Figura 15 e Quadro A12). Os aumentos nos conteúdos de fosfo-Akt, fosfo-S6 e S6 total no músculo EDL foram semelhantes entre os grupos. Após 30 dias de sobrecarga funcional no músculo EDL, os conteúdos das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas não apresentaram aumento significativo (Figuras 18-20 e Quadros A15-A18).

Figura 14 – Análise da proteína S6 total por *western blotting* no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



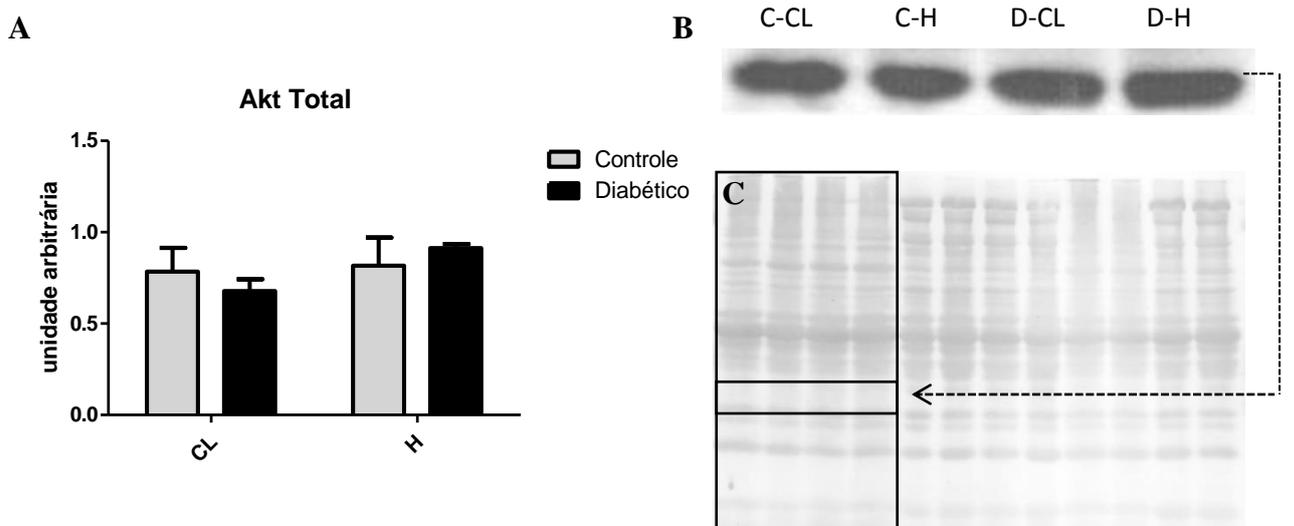
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 total no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 total no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 15 – Análise da proteína S6 fosforilada por *western blotting* do músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



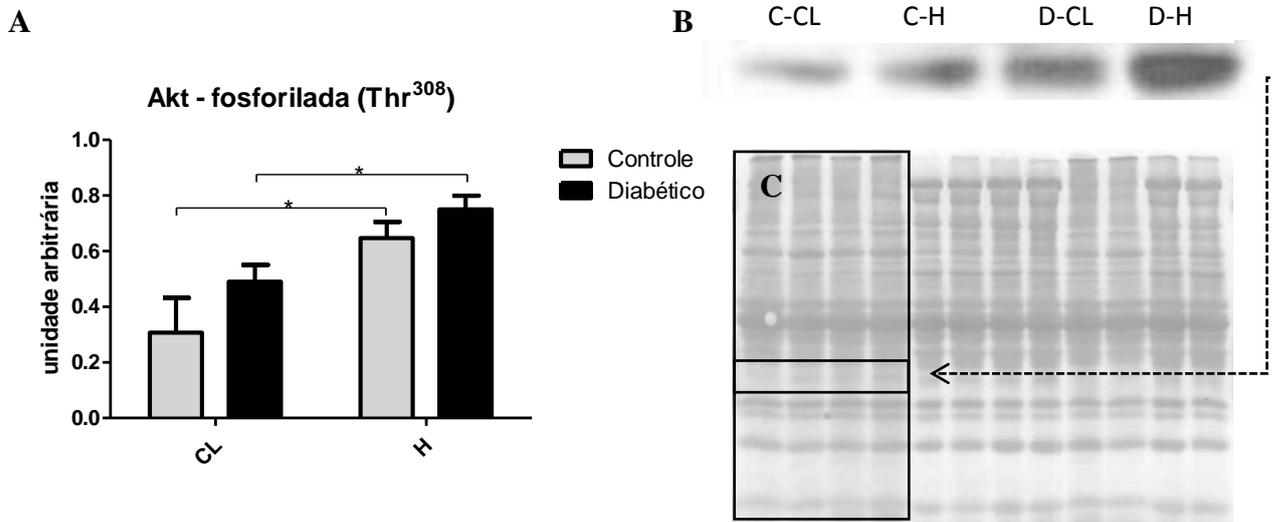
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de no mínimo 5 animais. **P<0,01; ***P<0,001, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 16 – Análise da proteína Akt total por *western blotting* do músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



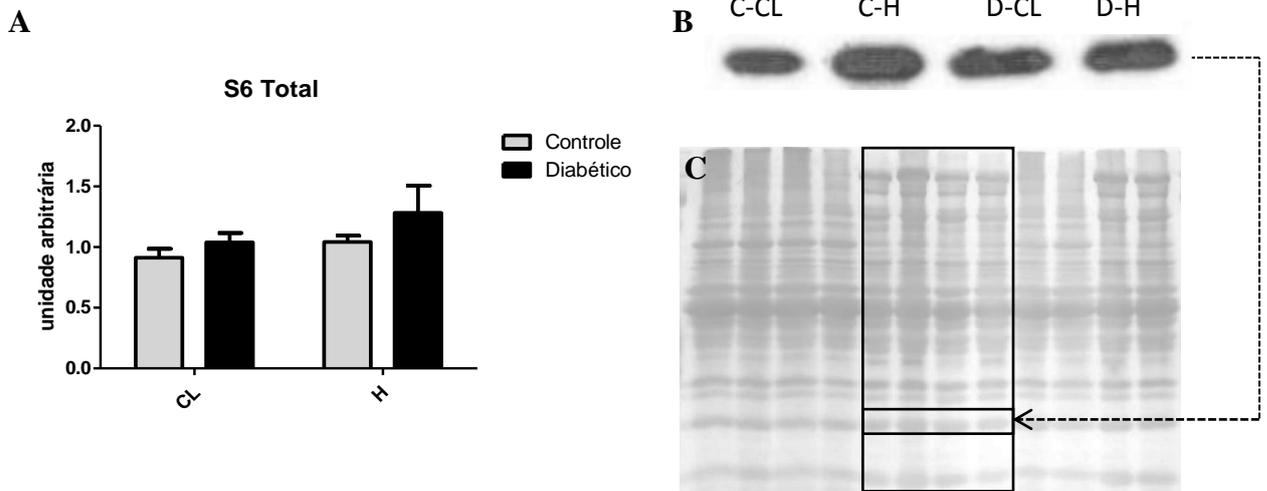
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína Akt total no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína Akt total no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. Utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 17 – Análise da proteína Akt fosforilada por *western blotting* do músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



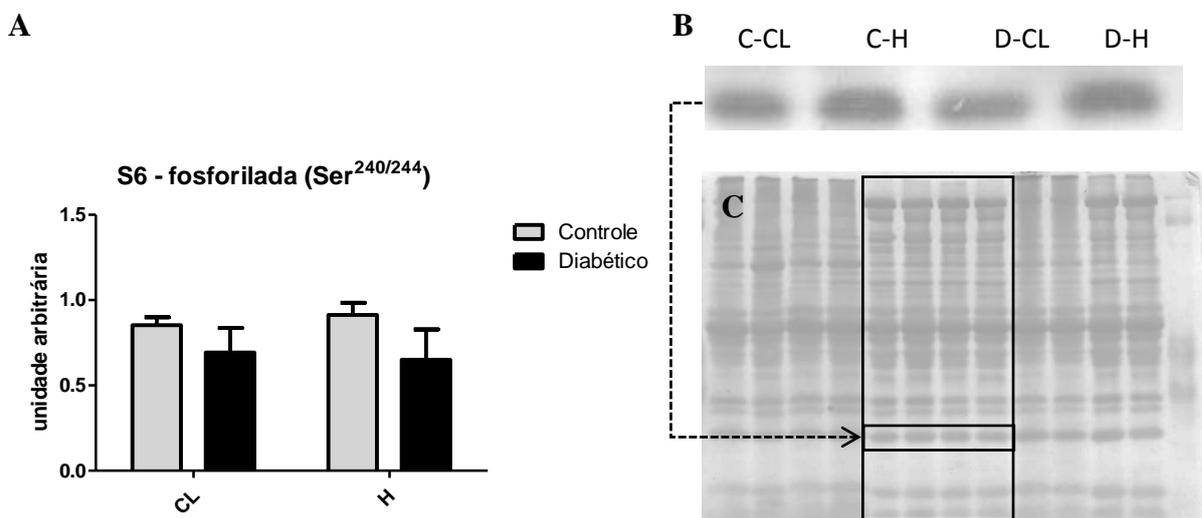
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína Akt fosforilada no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína Akt fosforilada no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0,05$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 18 – Análise da proteína S6 total por *western blotting* no músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



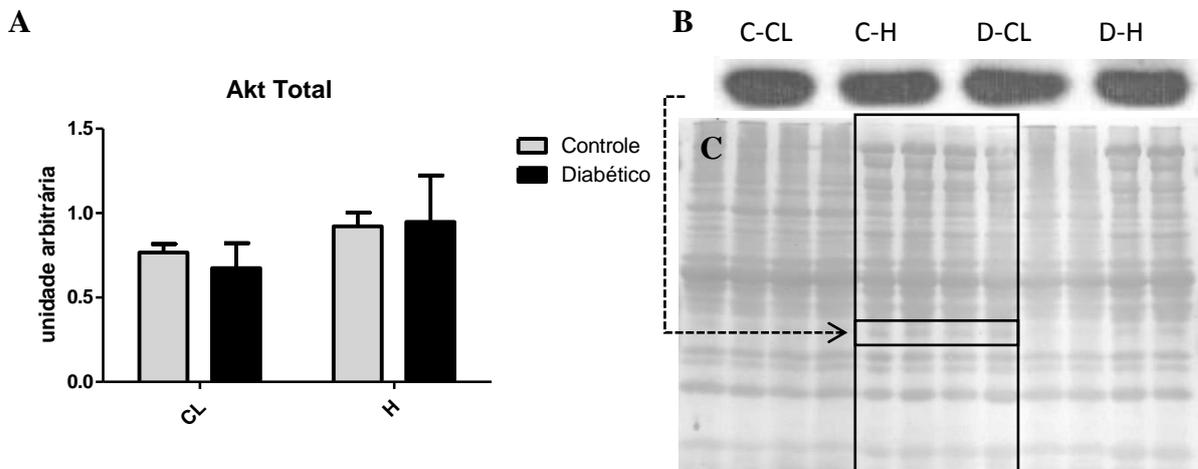
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 total no músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 total no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0,05$, pelo teste ANOVA *Two-way*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 19 – Análise da proteína S6 fosforilada por *western blotting* do músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



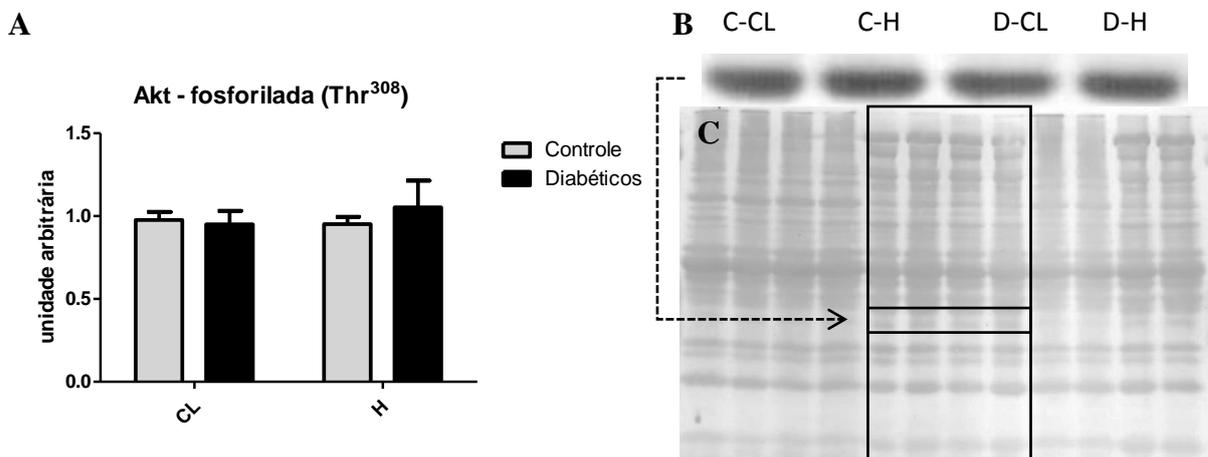
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. Foi utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 20 – Análise da proteína Akt total por *western blotting* do músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



(A) Análise quantitativa de western blotting da proteína Akt total no músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por western blotting da proteína Akt total no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de pelo menos 5 animais. Utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 21 – Análise da proteína Akt fosforilada total por *western blotting* do músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



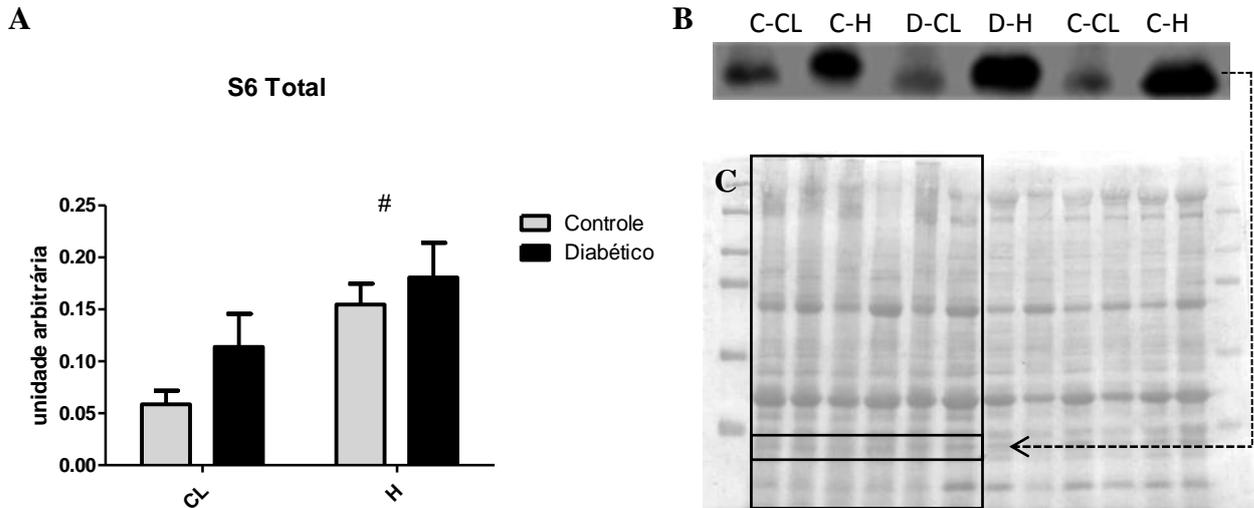
(A) Análise quantitativa de western blotting da proteína Akt fosforilada no músculo EDL após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por western blotting da proteína Akt fosforilada no músculo EDL. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. Utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

5.8 Conteúdos das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas no músculo sóleo

O efeito de quatro semanas de sobrecarga funcional sobre o conteúdo das proteínas S6 e Akt totais e fosforiladas também foi avaliado no músculo sóleo dos animais submetidos ao estado diabético por 8 semanas. Os resultados foram normalizados pela quantidade total de proteínas (Ponceau). O conteúdo de Akt total aumentou igualmente nos animais controles e diabéticos em 178% após 7 dias de sobrecarga (Figura 24 e Quadro A21). Houve aumento de fosfo-Akt (Thr308) em 126% no grupo controle e de 161% nos diabéticos após 7 dias de sobrecarga (Figura 25 e Quadro A22). O conteúdo de S6 total não mostrou aumento significativo (Figura 22 e Quadro A19). Entretanto, o conteúdo de fosfo-S6 aumentou em 375% no grupo controle e em 187,5% no grupo diabético (Figura 23 e Quadro A20) após 7 dias de sobrecarga no músculo sóleo. Os aumentos nos conteúdos de Akt total, fosfo-Akt e fosfo-S6 no músculo sóleo foram semelhantes entre os grupos.

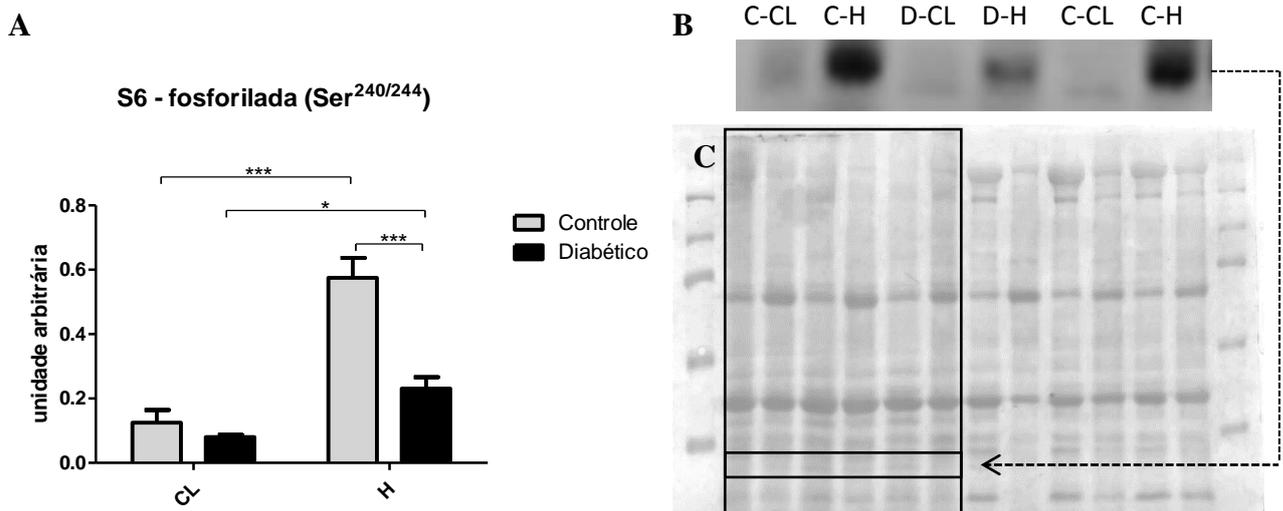
Após 30 dias de sobrecarga funcional, o conteúdo de proteínas fosfo-S6 não apresentou aumento significativo no músculo sóleo (Figura 27 e Quadro A24). O conteúdo de S6 total mostrou aumento de 225% somente no grupo diabético (Figura 28 e Quadro A23). Já a proteína Akt total aumentou em 162,5% no grupo diabético e em 150% no controle (Figura 28 e Quadro A25), enquanto que a fosfo-Akt (Thr308) apresentou aumento de 76% somente no grupo diabético (Figura 29 e Quadro A26).

Figura 22 – Análise da proteína S6 total por *western blotting* no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



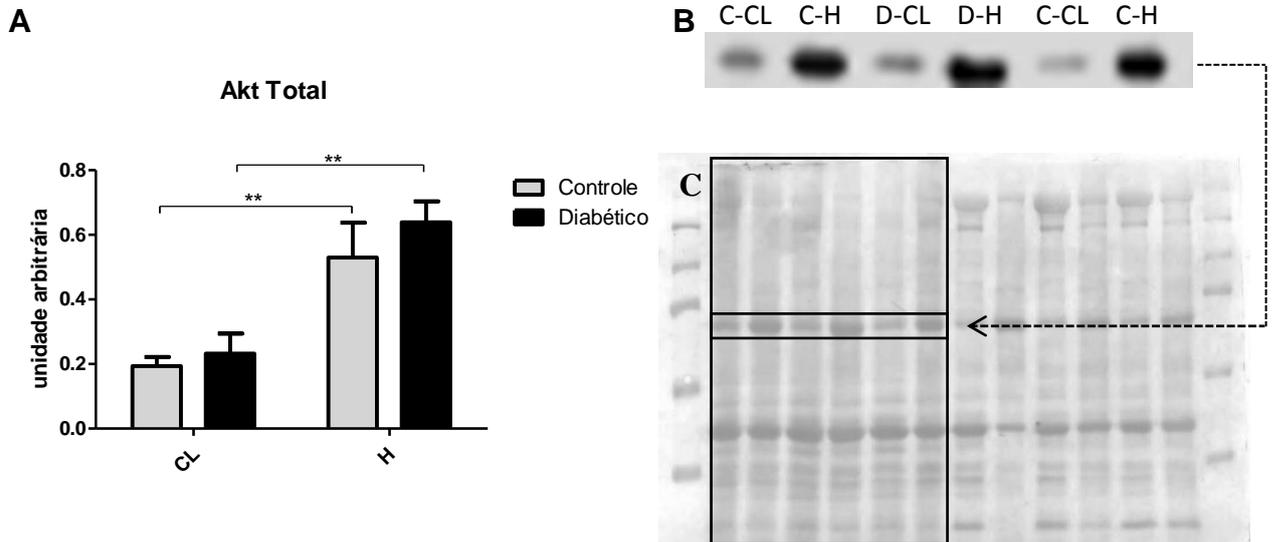
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 total no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 total no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada. #P=0,0103

Figura 23 – Análise da proteína S6 fosforilada por *western blotting* do músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



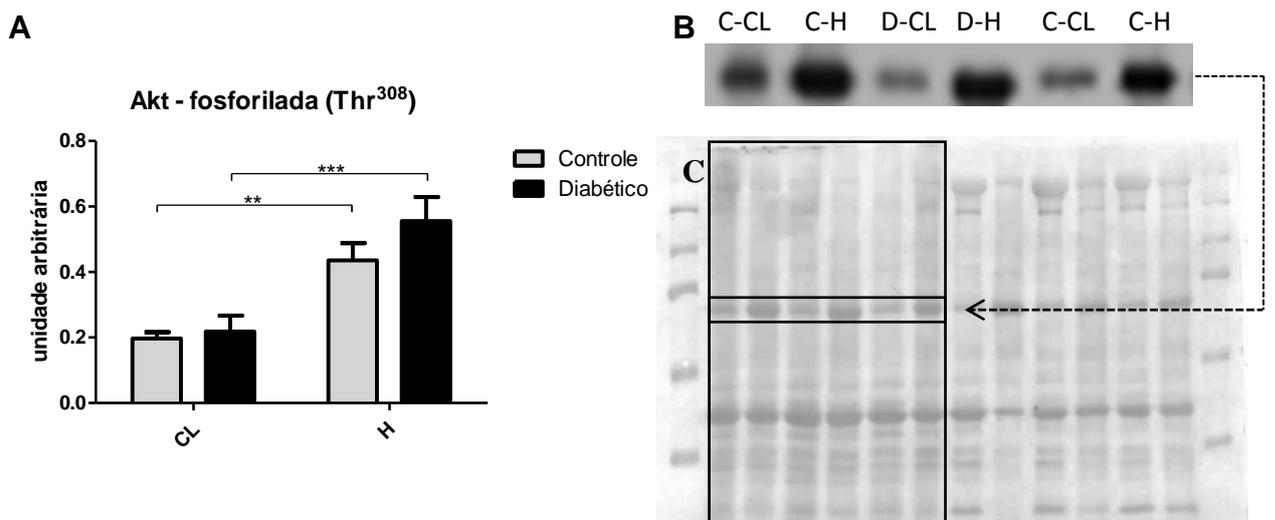
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 24 – Análise da proteína Akt total por *western blotting* do músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



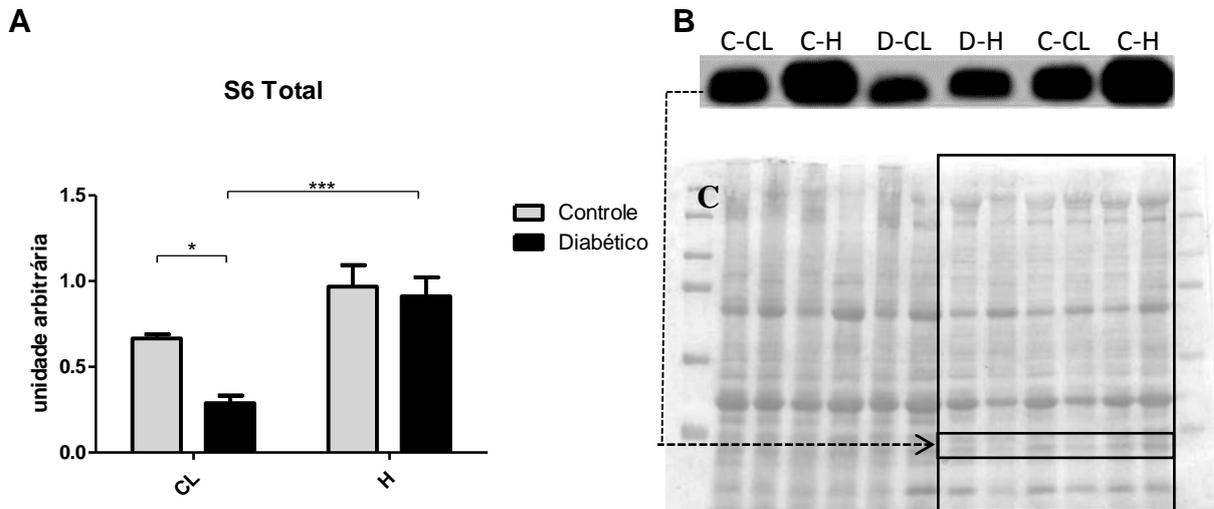
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína Akt total no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína Akt total no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. ** $P < 0,01$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 25 – Análise da proteína Akt fosforilada por *western blotting* do músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



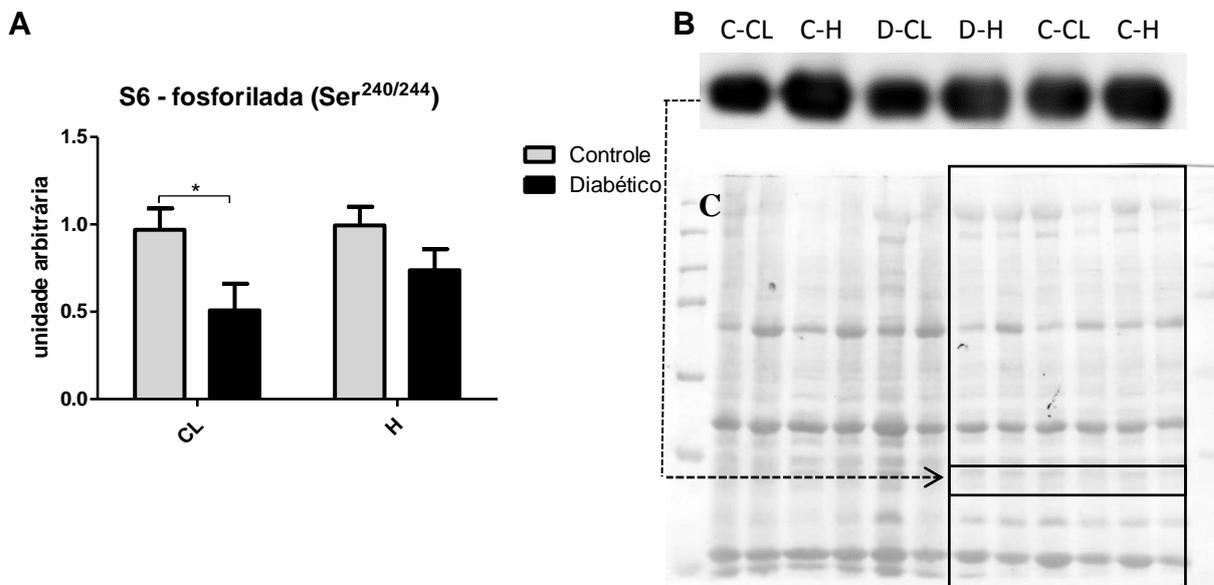
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína Akt fosforilada no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína Akt fosforilada no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 26 – Análise da proteína S6 total por *western blotting* no músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



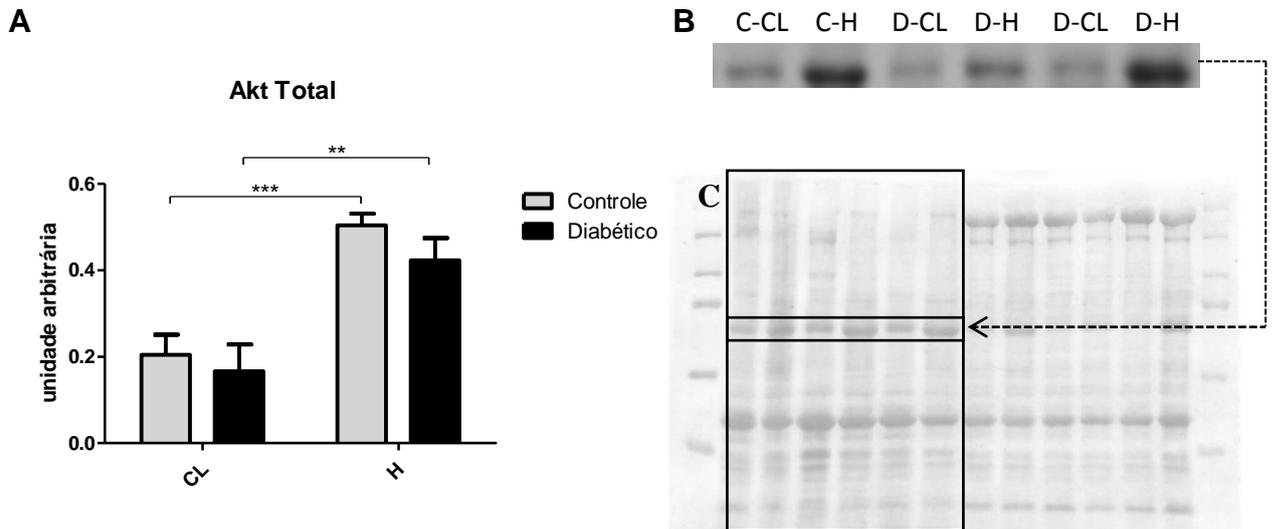
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 total no músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 total no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, pelo teste ANOVA Two-way. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 27 – Análise da proteína S6 fosforilada por *western blotting* do músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



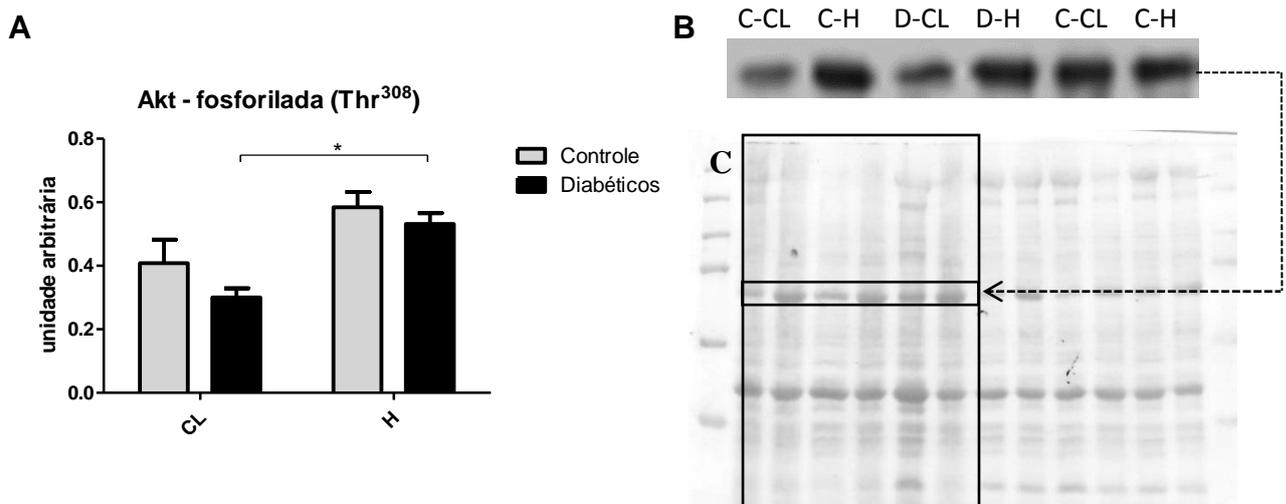
(A) Análise quantitativa de *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por *western blotting* da proteína S6 fosforilada no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0,05$, utilizado o teste ANOVA Two-way e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 28 – Análise da proteína Akt total por *western blotting* do músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



(A) Análise quantitativa de western blotting da proteína Akt total no músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por western blotting da proteína Akt total no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Figura 29 – Análise da proteína Akt fosforilada total por *western blotting* do músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional nos grupos controle e diabético



(A) Análise quantitativa de western blotting da proteína Akt fosforilada no músculo sóleo após 30 dias de sobrecarga funcional. (B) Imagem representativa da análise por western blotting da proteína Akt fosforilada no músculo sóleo. (C) Controle interno da quantidade de proteína utilizada (ponceau). Os valores estão apresentados como média \pm EPM de 6 animais. * $P < 0,05$, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. CL = pata contralateral, H = pata hipertrofiada, C-CL = Controle pata contralateral, C-H = Controle pata hipertrofiada, D-CL = Diabético pata contralateral, D-H = Diabético pata hipertrofiada.

Quadro 1 – Resumo dos resultados obtidos por *Western Blotting*.

Análise da função contrátil e morfologia dos músculos sóleo e EDL após 30 dias de sobrecarga funcional		
Grupos	Diabéticos	Controles
Força Absoluta (sóleo e EDL)	↑↑	↑↑↑
Força Específica (sóleo e EDL)	↑↑↑	↑↑
Hipertrofia (sóleo e EDL)	↑↑↑	↑↑↑
Resistência à Fadiga do EDL	↑	↔
Resistência à Fadiga do Sóleo	↓	↑
Análise das proteínas após 30 dias de sobrecarga funcional no <u>músculo EDL</u>		
p-S6	↔	↔
S6 total	↔	↔
p-Akt	↔	↔
Akt total	↔	↔
Análise das proteínas após 7 dias de sobrecarga funcional no <u>músculo EDL</u>		
p-S6	↑↑	↑↑
S6 total	↑	↑↑
p-Akt	↑↑	↑↑
Akt total	↔	↔
Análise das proteínas após 30 dias de sobrecarga funcional no <u>músculo sóleo</u>		
p-S6	↔	↔
S6 total	↑↑	↔
p-Akt	↑	↔
Akt total	↑	↑
Análise das proteínas após 7 dias de sobrecarga funcional no <u>músculo sóleo</u>		
p-S6	↑↑	↑↑↑
S6 total	↑	↑
p-Akt	↑↑↑	↑↑↑
Akt total	↑↑↑	↑↑↑

5.9 Expressão gênica de FAK, Wnt7a, MuRF-1, Atrogina-1, IGF-1 Eb, Miostatina, Folistatina, Ankrd2 e Axina2 avaliada por RT-PCR no músculo EDL

A quantidade de mRNA foi avaliada após 7 dias de sobrecarga funcional no músculo EDL (Tabela 2, Quadro A27). A quantidade de mRNA de FAK no músculo hipertrofiado de ratos diabéticos foi 24% maior que na pata contralateral. No grupo controle, a expressão de FAK foi aumentada em 133% devido à hipertrofia. A expressão de mRNA de IGF-1 Eb (MGF) apresentou aumento de 5 vezes na pata hipertrofiada dos animais diabéticos enquanto que nos controles foi de 9 vezes. A sobrecarga funcional reduziu a expressão de MuRF-1 (44%) e Atrogina-1 (68%) na pata hipertrofiada do grupo controle. A expressão de miostatina foi reduzida em 48% e 54%, respectivamente, nos animais diabéticos e controle. A folistatina apresentou aumento de 26% e a Ankrd2 de 165% nos animais diabéticos.

Tabela 2 – Expressão gênica por RT-PCR no músculo EDL.

Gene	Controle		Diabético	
	Hipertrofiado	Contralateral	Hipertrofiado	Contralateral
FAK	2,45 ± 0,47***	1,05 ± 0,20	1,28 ± 0,23	1,03 ± 0,14
Wnt 7a	0,52 ± 0,12	1,04 ± 0,29	0,43 ± 0,13	0,69 ± 0,14
MuRF-1	0,39 ± 0,08**	0,70 ± 0,06	0,39 ± 0,01	0,50 ± 0,03
Atrogina-1	0,32 ± 0,09*	1,00 ± 0,30	0,39 ± 0,06	0,71 ± 0,12
IGF-1 Eb (MGF)	9,81 ± 1,56***	0,95 ± 0,23	3,52 ± 0,79*	0,56 ± 0,17
Miostatina	0,30 ± 0,07**	0,66 ± 0,11	0,33 ± 0,06*	0,64 ± 0,04
Folistatina	1,22 ± 0,18	0,92 ± 0,23	1,24 ± 0,19*	0,98 ± 0,15
Ankrd2	0,59 ± 0,20	0,96 ± 0,34	1,46 ± 0,22*	0,55 ± 0,11
Axina 2	0,53 ± 0,04	0,96 ± 0,26	0,47 ± 0,05	0,72 ± 0,11

A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o HPRT1. Os valores estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 4 animais. *P<0,05, **P<0,01; ***P<0,001, como indicado por ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. Abreviaturas: FAK – *Focal adhesion kinase*; Wnt 7a – *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*; MuRF-1 – *Muscle RING-finger protein-1*; IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1 Eb-peptide*; Ankrd2 – *Ankyrin repeat domain 2*; HPRT1 – *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*.

5.10 Expressão gênica de FAK, Wnt7a, MuRF-1, Atrogina-1, IGF-1 Eb, Miostatina, Folistatina, Ankrd2 e Axina2 avaliada por RT-PCR no músculo sóleo

A quantidade de mRNA foi avaliada após 7 dias de sobrecarga funcional no músculo sóleo (Tabela 3, Quadro A28). A quantidade de mRNA de FAK no músculo submetido à sobrecarga funcional de ratos diabéticos foi 87% maior do que na pata contralateral. No grupo controle, esse valor foi 83% maior. A expressão de Wnt 7a no músculo hipertrofiado de ratos diabéticos foi 40% menor que na pata contralateral. No grupo controle, a expressão desse gene foi reduzida em 51% na pata hipertrofiada. O gene para IGF-1 Eb (MGF) apresentou aumento de 50 vezes em sua expressão na pata hipertrofiada nos animais diabéticos enquanto que nos

controles essa elevação foi de 23 vezes. Houve redução significativa na expressão de MuRF-1 e Atrogina-1 na pata hipertrofiada: MuRF-1 em 58% no grupo diabético e 61% no controle e Atrogina-1 em 65% nos animais diabéticos e 67% nos controles. A expressão de miostatina foi reduzida em 64% e 60% nos animais diabéticos e controle, respectivamente, nas patas hipertrofiadas. Por sua vez, a expressão de folistatina apresentou aumento de 78% nos diabéticos. A expressão de Ankrd2 foi reduzida em 25% nos diabéticos e em 50% nos controles devido à hipertrofia.

Tabela 3 – Expressão gênica por RT-PCR no músculo sóleo.

Gene	Controle		Diabético	
	Hipertrofiado	Contralateral	Hipertrofiado	Contralateral
FAK	1,85 ± 0,10***	1,01 ± 0,07	2,27 ± 0,10***	1,21 ± 0,13
Wnt 7a	0,15 ± 0,03 #	0,31 ± 0,06	0,24 ± 0,06 #	0,40 ± 0,05
MuRF-1	0,40 ± 0,07***	1,04 ± 0,13	0,38 ± 0,09**	0,91 ± 0,09
Atrogin-1	0,33 ± 0,06**	1,02 ± 0,09	0,42 ± 0,11***	1,22 ± 0,19
IGF-1 Eb (MGF)	24,36 ± 5,45**	0,99 ± 0,26	27,27 ± 8,52**	0,52 ± 0,13
Myostatin	0,37 ± 0,06*	0,93 ± 0,22	0,32 ± 0,10*	0,91 ± 0,20
Follistatin	1,03 ± 0,10	1,04 ± 0,14	1,09 ± 0,17*	0,61 ± 0,07
Ankrd2	0,52 ± 0,10*	1,06 ± 0,17	0,42 ± 0,09	0,56 ± 0,06
Axin 2	0,84 ± 0,03	1,03 ± 0,18	1,41 ± 0,08	1,42 ± 0,11

A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O gene de referência utilizado foi o HPRT1. Os valores estão apresentados como média ± EPM de pelo menos 4 animais. *P<0,05, **P<0,01; ***P<0,001, # P=0,0116, utilizado o teste ANOVA *Two-way* e pós-teste de *Bonferroni*. Abreviaturas: FAK – *Focal adhesion kinase*; Wnt 7a – *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*; MuRF-1 – *Muscle RING-finger protein-1*; IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1 Eb-peptide*; Ankrd2 – *Ankyrin repeat domain 2*; HPRT1 – *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*.

Quadro 2 – Resumo dos resultados obtidos por RT-PCR.

Análise da expressão gênica no músculo EDL após 7 dias de sobrecarga funcional		
Genes	Diabéticos	Controles
FAK	↑	↑↑
Wnt7a	↔	↔
MuRF-1	↔	↓↓
Atrogina-1	↔	↓↓
IGF-1 Eb (MGF)	↑↑	↑↑↑
Miostatina	↓↓	↓↓
Folistatina	↑↑	↔
Ankrd2	↑↑	↔
Axina2	↔	↔
Análise da expressão gênica no músculo sóleo após 7 dias de sobrecarga funcional		
Genes	Diabéticos	Controles
FAK	↑↑↑	↑↑
Wnt7a	↓	↓
MuRF-1	↓↓	↓↓↓
Atrogina-1	↓↓↓	↓↓
IGF-1 Eb (MGF)	↑↑↑	↑↑
Miostatina	↓↓	↓↓
Folistatina	↑↑	↔
Ankrd2	↔	↓↓↓
Axina2	↔	↓

6 DISCUSSÃO

A sobrecarga compensatória por 30 dias causou hipertrofia semelhante dos músculos sóleo e EDL nos animais controles e diabéticos. Houve aumento significativo das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas. No entanto, a ativação das vias de síntese (fosfo-Akt e fosfo-S6) persistiu no músculo sóleo por até 30 dias, enquanto no EDL isto não acontece. Quando os músculos EDL e sóleo foram submetidos a 7 dias de sobrecarga funcional, genes relacionados à hipertrofia muscular esquelética apresentaram aumento significativa na sua expressão. Houve diferença na expressão dos genes entre os músculos EDL e sóleo no modelo de sobrecarga funcional e diabetes.

Farrell e colaboradores (1999) mostraram que é possível induzir hipertrofia muscular esquelética em animais diabéticos por meio de exercícios resistidos (FARRELL et al., 1999). Eles apresentaram a hipótese de que na resposta hipertrófica, a via de sinalização do IGF pode substituir a da insulina. O IGF estimula a via de síntese proteica quando, por exemplo, induzida por sobrecarga funcional, promovendo hipertrofia (BODINE et al., 2001; COLEMAN et al., 1995; SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011). Contudo, a hipertrofia por sobrecarga funcional não depende exclusivamente de estímulo advindo da via do IGF-I no músculo esquelético, pois ocorre mesmo quando os receptores desse fator estão inativados (KLOSSNER et al., 2009; SPANGENBURG et al., 2008). O IGF-I, quando ligado ao seu receptor, ativa a via PI(3)K/Akt/mTOR e seus principais efetores (p70S6K, S6, 4EBP-1) que atuam na síntese de proteínas miofibrilares. A fosforilação da p70S6K leva à sua ativação e a fosforilação da 4EBP-1 não permite a sua ligação em eIF4E e a deixa livre para promover síntese proteica ligando-se ao ribossomo (RICHTER; SONENBERG, 2005; BODINE et al., 2001; BODINE, 2006).

O MGF (*mechano-growth fator*) também está envolvido no processo hipertrófico. É uma variante do gene do IGF, sendo produzido localmente no músculo esquelético quando este é submetido à estresse mecânico (HILL; GOLDSPINK, 2003). O MGF é chamado de IGF-Eb no rato e de IGF-Ec em humanos (GOLDSPINK 2002, 2005). Quando liberado por ação mecânica no músculo esquelético causa hipertrofia local ativando a via de síntese proteica. O MGF também sinaliza por quimiotaxia às células satélites, induzindo seu recrutamento para o local da lesão visando a regeneração do músculo esquelético

(GOLDSPINK, 2005; PHILIPPOU et al., 2007; 2009). Quando os músculos EDL e sóleo foram submetidos a 7 dias de sobrecarga funcional, a expressão de MGF apresentou variação importante. No músculo EDL, a expressão de mRNA do MGF aumentou nos dois grupos. Entretanto, nos controles, o aumento foi quase duas vezes mais proeminente que nos diabéticos. No músculo sóleo ocorreu o inverso, a expressão nos animais diabéticos aumentou mais de duas vezes comparada a dos controles, demonstrando efeitos distintos entre EDL e sóleo.

Animais diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam concentração residual de insulina no plasma, que é inferior à concentração plasmática desse hormônio no estado de jejum de 6 horas (dados não publicados do grupo). Conforme dados do presente estudo, valores plasmáticos reduzidos de insulina não afetam o processo hipertrófico induzido por sobrecarga funcional nos músculos sóleo e EDL.

Durante o período de 30 dias de sobrecarga funcional, os animais diabéticos apresentaram hipertrofia semelhante aos controles nos músculos EDL e sóleo. Por que o animal resistente à insulina tem comprometimento da hipertrofia muscular e o animal com deficiência de insulina no plasma não? O efeito da insulina sobre o músculo esquelético é menor nos dois modelos: um por ser resistente e outro por ter menor concentração plasmática do hormônio. A resistência à insulina e a baixa secreção deste hormônio estão diretamente ligados aos produtos avançados de glicação, que são gerados em meio interno hiperglicêmico e comprometem vias de sinalização, tais como: PKC, NF- κ B e TGF- β (BROWNLEE, 2001; RIBOULET-CHAVEY et al., 2006), levando à diminuição do sinal hipertrófico. A deficiência hipertrófica está associada ao aumento da atividade da AMPK e menor biogênese mitocondrial presentes nos quadros de DMT1 e 2 (THOMSON; GORDON, 2005). Os produtos avançados de glicação contribuem para os principais efeitos deletérios do DM sobre o músculo esquelético (hipertrofia e diferenciação celular) (dados não publicados do nosso grupo). Na resistência à insulina, o mecanismo de síntese proteica é prejudicado pois não há ativação (fosforilar) da mTOR por meio do complexo TSC, o que leva a uma menor hipertrofia (PATURI et al., 2010). Em camundongos diabéticos, ocorre quadro semelhante na regeneração muscular, com menor geração de força (VIGNAUD et al., 2007). Sitnick e colaboradores (2009) mostraram que camundongos submetidos à uma dieta hiperlipídica apresentam menor ativação de Akt e p70S6K1 em 7, 14 e 30 dias após serem submetidos à

sobrecarga compensatória no músculo plantar, comprometendo a hipertrofia (SITNICK; BODINE; RUTLEDGE, 2009).

Klossner e colaboradores (2009) demonstraram que a quinase de adesão focal (FAK), quando fosforilada no resíduo de tirosina 397, ativa a p70S6K e conseqüentemente promove hipertrofia sob estímulo mecânico. Fluck e colaboradores (1999) hipotetizaram que a FAK é de extrema importância para a hipertrofia do músculo esquelético quando estimulada por fatores mecânicos (FLÜCK *et al.*, 1999). Esse efeito da FAK não depende da Akt, que não é ativada neste processo (KLOSSNER *et al.*, 2009). Crossland e colaboradores (2013) mostraram em células C2C12 que a ablação da proteína FAK causa diminuição da hipertrofia e da síntese total de proteínas. A via mTOR-rbS6-eIF4F é comprometida e afeta a hipertrofia mediada por IGF-1 (CROSSLAND *et al.*, 2013). No músculo EDL, a expressão de FAK aumentou no grupo controle mas não no diabético. No sóleo, esse aumento ocorreu nos dois grupos sendo maior no diabético, justificando uma possível compensação no mecanismo de hipertrofia do músculo. Essas diferenças foram também observadas em modelos de sobrecarga funcional e de atrofia (GORDON; FLÜCK; BOOTH, 2001) nos músculos sóleo e plantar. O gene *Ankrd2* também está relacionado com sinais mecânicos no músculo esquelético (KOJIC *et al.*, 2004) e apresenta respostas diferentes entre EDL e sóleo. Houve redução na expressão de *Ankrd2* no músculo sóleo no grupo controle, enquanto que no EDL sua expressão se elevou no grupo diabético em resposta à sobrecarga funcional por 7 dias.

Outros autores demonstraram que um componente da família Wnt, o Wnt7a, quando ligado a seu receptor Fzd7 ativa a via Fzd7/PI(3)K/Akt/mTOR induzindo hipertrofia miofibrilar por mecanismo alternativo à ativação dos receptores de IGF e insulina (VON MALTZAHN *et al.*, 2012). A via do Wnt também promove hipertrofia por via canônica, envolvendo a β -catenina que é ativada durante a sobrecarga do músculo esquelético. Esses dados são indicativos de que a sobrecarga mecânica também resulta em aumento significativo nos componentes da via Wnt. Estes componentes possuem alvos conhecidos, tais como c-Myc e ciclina D1, que contribuem para o crescimento hipertrófico (ARMSTRONG; ESSER, 2005).

A família Wnt compreende um amplo grupo de glicoproteínas secretadas em vários processos biológicos. Cada Wnt se liga ao seu receptor específico *Frizzled* (Fzd), ativando a via de sinalização. Estes peptídeos ricos em cisteína sofrem

modificações químicas por reações de oxidação-redução ou por lipídios, por exemplo palmitoilação (AMERONGEN et al., 2009; HUELSKEN; BEHRENS, 2002; KATOH; KATOH, 2007; WODARZ; NUSSE, 1998). Em nosso estudo, a expressão de Wnt7a (via não canônica) não influenciou a hipertrofia dos músculos sóleo e EDL, pois houve redução no conteúdo desse gene. A expressão de Axina2 (via canônica) não sofreu mudança em sua expressão no músculo sóleo hipertrofiado. Entretanto os animais diabéticos apresentaram maior conteúdo do que o controle em ambas as patas contralateral e hipertrofiada, indicando possível ativação da via da β -catenina no músculo sóleo em decorrência do quadro diabético.

Os conteúdos dos sinalizadores da via de síntese de proteínas (Akt fosforilada e S6 total e fosforilada) aumentaram no músculo de contração rápida (EDL) quando submetido à sobrecarga funcional por 7 dias, essas observações corroboram resultados encontrados por outros autores (MIYAZAKI et al., 2011; THOMSON; GORDON, 2006) quando induziram sobrecarga funcional por 7 dias no músculo plantar em ratos por ablação sinérgica. Quando o músculo EDL foi submetido a 30 dias de sobrecarga funcional, as proteínas não apresentaram diferença significativa em seus conteúdos total e fosforilado, mostrando que a atividade da via de síntese proteica retorna aos valores de pré-sobrecarga. Outros autores (PETERSON et al., 2008) induziram sobrecarga no músculo plantar por ablação sinérgica por 7 e 21 dias e o sinal hipertrófico também foi reduzido aos valores de pré-sobrecarga após 21 dias.

Quando o músculo sóleo foi submetido a 30 dias de sobrecarga funcional, as proteínas da via de síntese apresentaram diferença significativa em seus conteúdos total (Akt no grupo controle e diabético; S6 no grupo diabético) e fosforilado (S6 no grupo diabético somente). Assim, a atividade desta se mantém elevada por mais tempo no músculo sóleo quando comparada ao EDL. Spangenburg e colaboradores (2008) induziram sobrecarga funcional no músculo plantar por 7 e 35 dias. Após 35 dias, a massa muscular continuava a aumentar, evidenciando a ativação persistente da síntese proteica (SPANGENBURG et al., 2008). Ochi e colaboradores (2008) induziram hipertrofia do gastrocnêmio em ratos por meio de exercícios excêntricos e observaram que, após 20 dias, os conteúdos das proteínas mTOR, p70S6K e Akt fosforiladas estavam mais elevados do que em 10 dias, mostrando que a ativação da via de síntese persistia por mais tempo (OCHI et al., 2010). A ativação das proteínas das vias de síntese mantida por período de tempo mais longo pode ser

devido a maior susceptibilidade deste músculo a uma lesão induzida por contração em ratos diabéticos (COPRAY et al., 2000).

Após sofrer sobrecarga funcional por 30 dias, a força específica dos músculos sóleo e EDL se elevou mais nos animais diabéticos em relação aos controles. A resistência à fadiga foi maior no músculo EDL dos animais diabéticos submetidos a 30 dias de sobrecarga funcional, mas foi menor no músculo sóleo. Nakagawa e colaboradores (1989) mostraram que a concentração intrassarcoplasmática de Cálcio é mais elevada em animais diabéticos. Nessa condição, as respostas contráteis se tornam mais intensas no músculo esquelético (NAKAGAWA et al., 1989). O excesso de Cálcio no sarcoplasma pode sobrecarregar as bombas (SERCA) de recaptção deste íon para o interior do retículo sarcoplasmático, causando acúmulo no sarcômero, comprometendo a contração muscular e provocando fadiga precoce.

O músculo sóleo de ratos e camundongos apresenta menor resistência à fadiga, pois contém menor densidade de SERCA quando comparado ao EDL (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). Há inibição da SERCA por exposição a concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio. Estas estão mais elevadas no músculo do diabético. Com isso há menor recaptção de Cálcio e a sensibilidade miofibrilar a este íon aumenta, alterando a cinética da contração muscular, sendo mais pronunciada no músculo sóleo do diabético (ANDRADE et al., 2001; ANDRADE et al., 1998). Copray e colaboradores (2000) mostraram que o músculo sóleo de ratos diabéticos é mais susceptível à lesão induzida por contração que o EDL. Isto sugere que a fadiga precoce pode estar associada à lesão no músculo sóleo. Os conteúdos de ATP (FEWELL; MOERLAND, 1995; MOORE et al., 1983), fosfocreatina (FEWELL; MOERLAND, 1995) e as atividades de fosfofrutoquinase, citrato sintase e citocromo oxidase estão reduzidos no músculo sóleo de animais diabéticos (FEWELL; MOERLAND, 1995). Tais alterações no ATP, fosfocreatina e atividade de enzimas não são observadas no EDL (FEWELL; MOERLAND, 1995) desses animais. Essas diferenças devem estar relacionadas com a fadiga precoce no músculo sóleo.

Houve redução significativa na expressão dos atrogenes, MuRF-1 e Atrogina-1, após 7 dias de sobrecarga no músculo sóleo. Com a ativação da via da PI(3)K/Akt/mTOR, essas proteínas são inativadas pela inibição de uma proteína sinalizadora *upstream*, nesse caso a FOXO (STITT et al., 2004).

Miostatina e folistatina regulam a hipertrofia muscular esquelética (GILSON et al., 2009). A miostatina inibe e a folistatina induz hipertrofia (GILSON et al., 2009). Nos músculos sóleo e EDL a expressão de miostatina diminuiu com a hipertrofia enquanto que a folistatina não se alterou no grupo controle mas aumentou no diabético.

Pacientes diabéticos descompensados apresentam disfunção motora e atrofia muscular acentuadas, além de comprometimento postural e na realização das atividades da vida diária. A recuperação da força muscular melhora a função motora e a postura. Assim, as atividades da vida diária do paciente diabético podem ser expressivamente melhoradas por um programa de treinamento de força.

7 CONCLUSÃO

A sobrecarga funcional causou hipertrofia semelhante nos músculos sóleo e EDL nos animais controles e diabéticos, com aumento das forças tetânica e isotônica, absolutas e específicas. O músculo EDL hipertrofiado se tornou mais resistente à fadiga nos animais diabéticos, mas não houve mudança nos controles. O músculo sóleo hipertrofiado se tornou menos resistente à fadiga nos animais diabéticos e mais resistente nos controles. A ativação das vias de síntese (fosfo-Akt e fosfo-S6) persistiu por até 30 dias no músculo vermelho. O aumento no conteúdo de mRNA de IGF-1 Eb foi mais pronunciado no músculo sóleo do que no EDL devido à sobrecarga funcional. A expressão de mRNA da FAK aumentou no músculo sóleo nos dois grupos, mas no EDL se elevou somente no grupo controle. A hipertrofia causou aumento na expressão de Ankrd2 no EDL dos diabéticos e redução no sóleo dos controles. Os músculos dos animais diabéticos sofrem alterações fenotípicas semelhantes porém com o envolvimento de vias moleculares distintas.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, G. R. et al. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 96, n. 5, p. 1613–1618, 2004.

ADAMS, G. R. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. **Science**, v. 31, p. 782–791, 2006.

ALWAY, S. E. et al. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2, p. R540–549, 2003.

ALWAY, S. E. et al. Muscle hypertrophy models: applications for research on aging. **Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquée**, v. 30, n. 5, p. 591–624, 2005.

ANDRADE, F. H. et al. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. **The Journal of Physiology**, v. 509, Pt 2, n. 1998, p. 565–575, 1998.

ANDRADE, F. H.; REID, M. B.; WESTERBLAD, H. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 2, p. 309–311, 2001.

ARMSTRONG, D. D.; ESSER, K. A. Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. **American Journal of Physiology. Cell physiology**, v. 289, n. 4, p. C853–859, 2005.

ARMSTRONG, R. B. et al. Acute hypertrophic response of skeletal muscle to removal of synergists. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, 1979.

ARMSTRONG, R. B.; IANUZZO, C. D. Compensatory hypertrophy of skeletal muscle fibers in streptozotocin-diabetic rats. **Cell and Tissue Research**, v. 181, n. 2, p. 255–266, 1977.

ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 36, n. 1, p. S67–74, 2013. Suppl 1.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, 2012.

* De acordo com:

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

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 1 Pt 1, p. C120–127, 1999.

BAKER, J. et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 73–82, 1993.

BALDWIN, K. M. et al. Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 52, n. 2, p. 467–472, 1982.

BARAZZONI, R. et al. Myostatin expression is not altered by insulin deficiency and replacement in streptozotocin-diabetic rat skeletal muscles. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 23, n. 6, p. 1413–1417, 2004.

BARAZZONI, R. et al. Insulin fails to enhance mTOR phosphorylation, mitochondrial protein synthesis and ATP production in human skeletal muscle without amino acid replacement. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, 2012.

BARK, T. H. et al. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 1 Pt 1, p. E118–123, 1998.

BAUM, O. et al. Irregular costameres represent nitric oxide synthase-1-positive sarcolemma invaginations enriched in contracted skeletal muscle fibres. **The Histochemical Journal**, v. 32, n. 12, p. 743–751, 2000.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, 1991.

BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, p. 1–16, 2012.

BHASIN, S. et al. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 1, p. 1–7, 1996.

BHASIN, S.; WOODHOUSE, L.; STORER, T. W. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. **The Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 1, p. 27–38, 2001.

BINGLEY, P. J. Clinical applications of diabetes antibody testing. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 1, p. 25–33, 2010.

BINKHORST, R. A. The effect of training on some isometric contraction characteristics of a fast muscle. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 309, n. 3, p. 193–202, 1969.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001.

BODINE, S. C.; BAAR, K. Analysis of skeletal muscle hypertrophy in models of increased loading. **Methods in Molecular Biology**, v. 798, n. 2, p. 213–229, 2012.

BODINE, S. U. E. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 38, n. 11, p. 1950–7, 2006.

BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiological Reviews**, 1991.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.

BURKHOLDER, T. J. Mechanotransduction in skeletal muscle. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 12, n. 404, p. 174–191, 2007.

CARPENTER, C. L. et al. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 32, p. 19704–19711, 1990.

CARSON, J. A.; WEI, L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 88, n. 1, p. 337–343, 2000.

COHN, R. D. et al. Secondary reduction of alpha7B integrin in laminin alpha2 deficient congenital muscular dystrophy supports an additional transmembrane link in skeletal muscle. **Journal of the neurological sciences**, v. 163, n. 2, p. 140–152, 1999.

COLEMAN, M. E. et al. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. **The Journal of Biological Chemistry**, 1995.

COLOGNATO, H.; WINKELMANN, D. A.; YURCHENCO, P. D. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. **The Journal of cell biology**, v. 145, n. 3, p. 619–631, 1999.

COPRAY, S. et al. Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in muscle fibers and activated satellite cells. **Experimental neurology**, v. 161, n. 2, p. 597–608, 2000.

COX, V. M. et al. Growth induced by incremental static stretch in adult rabbit latissimus dorsi muscle. **Experimental physiology**, v. 85, n. 2, p. 193–202, 2000.

CRISWELL, D. S. et al. Overexpression of IGF-I in skeletal muscle of transgenic mice does not prevent unloading-induced atrophy. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 3 Pt 1, p. E373–379, 1998.

CROSSLAND, H. et al. Focal adhesion kinase is required for IGF-I-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/m TOR/S6K1-associated pathway. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 305, n. 2, p. E183–193, 2013.

DANOWSKI, B. A et al. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 6, p. 1411–1420, set. 1992.

DEGENS, H.; TUREK, Z.; BINKHORST, R. A. Compensatory hypertrophy and training effects on the functioning of aging rat m. plantaris. **Mechanisms of ageing and development**, v. 66, n. 3, p. 299–311, 1993.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and comparative endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 344–351, 2010.

DUNCAN, N. D.; WILLIAMS, D. A; LYNCH, G. S. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 77, n. 4, p. 372–8, 1998.

FARRELL, P. A. et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 3, p. 1075–1082, 1999.

FERGUSON, R. E. et al. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 566–571, 2005.

FEWELL, J. G.; MOERLAND, T. S. Responses of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: myosin isoenzymes and phosphorous metabolites. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 148, n. 2, p. 147–154, 1995.

FLÜCK, M. et al. Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 1 Pt 1, p. C152–162, 1999.

GIANNOULIS, M. G. et al. The effects of growth hormone and/or testosterone on whole body protein kinetics and skeletal muscle gene expression in healthy elderly men: a randomized controlled trial. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3066–3074, 2008.

GILSON, H. et al. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. E157–164, 2009.

GINGRAS, A C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 913–963, 1999.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 1974–1984, 2005.

GOLDBERG, A. L. Role of insulin in work-induced growth of skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 83, n. 5, p. 1071–1073, 1968.

GOLDSPINK, G. et al. Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 19, n. 2, p. 368–373, 1991.

GOLDSPINK, G. Gene expression in skeletal muscle. **Biochemical Society transactions**, v. 30, n. 2, p. 285–290, 2002.

GOLDSPINK, G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 20, p. 232–238, 2005.

GOLDSPINK, G. Research on mechano growth factor: its potential for optimising physical training as well as misuse in doping. **British journal of sports medicine**, v. 39, n. 11, p. 787–8; discussion 787–788, 2005.

GORDON, S. E.; FLÜCK, M.; BOOTH, F. W. Selected Contribution: Skeletal muscle focal adhesion kinase, paxillin, and serum response factor are loading dependent. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 90, n. 3, p. 1174–1183; discussion 1165, 2001.

GRAVHØLT, C. H. et al. Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. E848–854, 1999.

GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, K. et al. High glucose-mediated alterations of mechanisms important in myogenesis of mouse C2C12 myoblasts. **Cell biology international**, v. 37, n. 1, p. 29–35, 2013.

GUTH, L.; YELLIN, H. The dynamic nature of the so-called “fiber types” of mammalian skeletal muscle. **Experimental neurology**, v. 31, n. 2, p. 227–300, 1971.

HADDAD, F.; ADAMS, G. R. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 96, n. 1, p. 203–210, 2004.

HAMILTON, D. L. et al. A limited role for PI(3,4,5)P3 regulation in controlling skeletal muscle mass in response to resistance exercise. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11624, 2010.

HARRIDGE, S. D. R. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Experimental physiology**, v. 92, n. 5, p. 783–797, 2007.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & development**, v. 18, n. 16, p. 1926–1945, 2004.

HAYAMA, M. et al. ERK and p38 MAP kinase are involved in arachidonic acid release induced by H₂O₂ and PDGF in mesangial cells. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 282, n. 3, p. F485–491, 2002.

HILENSKI, L. L.; TERRACIO, L.; BORG, T. K. Myofibrillar and cytoskeletal assembly in neonatal rat cardiac myocytes cultured on laminin and collagen. **Cell and tissue research**, v. 264, n. 3, p. 577–587, 1991.

HILL, M.; GOLDSPINK, G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **The Journal of physiology**, v. 549, n. Pt 2, p. 409–418, 2003.

HORNBERGER, T. A; ESSER, K. A. Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 331–335, 2004.

HORNBERGER, T. A; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquée**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004.

HUELSKEN, J.; BEHRENS, J. The Wnt signalling pathway. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 21, p. 3977–3978, 2002.

INGBER, D. E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. **Annual review of physiology**, v. 59, p. 575–599, 1997.

IQBAL, J.; ZAIDI, M. Molecular regulation of mechanotransduction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 328, n. 3, p. 751–755, 2005.

ISHIHARA, A. et al. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 84, n. 6, p. 2183–2189, 1998.

JACKSON, J. R. et al. Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 303, n. 8, p. C854–861, 2012.

JAMES, N. T. Compensatory muscular hypertrophy in the extensor digitorum longus muscle of the mouse. **Journal of anatomy**, v. 122, n. Pt 1, p. 121–131, 1976.

JOHNSTON, A. P. W. et al. Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. **Physiology**, n. November 2006, 2012.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. **The Biochemical journal**, v. 142, n. 3, p. 673–683, 1974.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. The metabolic fate and elimination of streptozotocin. **Biochemical Society transactions**, v. 3, n. 3, p. 410–414, 1975.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. **Diabetologia**, v. 12, n. 5, p. 483–488, 1976.

KATOH, M.; KATOH, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 14, p. 4042–4045, 2007.

KIMBALL, S. R.; FARRELL, P. A.; JEFFERSON, L. S. Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 93, n. 3, p. 1168–1180, 2002.

KLOSSNER, S. et al. Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK. **European journal of applied physiology**, v. 106, n. 3, p. 389–398, 2009.

KOJIC, S. et al. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. **Journal of molecular biology**, v. 339, n. 2, p. 313–325, 2004.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589–3594, 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, p. 1–4, 2012.

LENZEN, S. Alloxan and Streptozotocin Diabetes. In: ELMAR PESCHKE (Ed.). **Endocrinology III lectures within the “time structures of endocrine systems” project framework**. Leipzig: Saxon Academy of Sciences, 2007. p. 119–138.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

LIKE, A A; ROSSINI, A A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 193, n. 4251, p. 415–417, 1976.

LIU, J. P. et al. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). **Cell**, v. 75, n. 1, p. 59–72, 1993.

LIU, Z. et al. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. **The Journal of nutrition**, v. 136, p. 212S–217S, 2006, n. 1 Suppl.

LJUBISAVLJEVIC, M.; QURESHI, A; NAGELKERKE, N. The effects of neuropeptide Y on skeletal muscle contractile properties in streptozotocin diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 333, n. 1-2, p. 27–32, 2010.

LOWE, D. A; ALWAY, S. E. Animal models for inducing muscle hypertrophy: are they relevant for clinical applications in humans? **The Journal of orthopaedic and sports physical therapy**, v. 32, n. 2, p. 36–43, 2002.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2009.

MAYER, C. et al. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. **Genes & development**, v. 18, n. 4, p. 423–434, 2004.

MCCALL, G. E. et al. Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 84, n. 4, p. 1407–1412, 1998.

MCPHERRON, A C.; LAWLER, A M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, 1997.

MITRA, S. K.; HANSON, D. A; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 56–68, 2005.

MIYAZAKI, M. et al. Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 7, p. 1831–1846, 2011.

MOORE, R. D.; MUNFORD, J. W.; PILLSWORTH, T. J. Effects of streptozotocin diabetes and fasting on intracellular sodium and adenosine triphosphate in rat soleus muscle. **The Journal of physiology**, v. 338, p. 277–294, 1983.

NAKAGAWA, M. et al. Diabetic state-induced modification of Ca, Mg, Fe and Zn content of skeletal, cardiac and smooth muscles. **Endocrinologia japonica**, v. 36, n. 6, p. 795–807, 1989.

OCHI, E.; ISHII, N.; NAKAZATO, K. Time course change of IGF1 / Akt / mTOR / p70s6k pathway activation in rat gastrocnemius muscle during repeated bouts of eccentric exercise. **Journal of sports sciences & Medicine**, v. 9, n. June, p. 170–175, 2010.

OUYANG, J.; ALWAY, S. E. Transgene expression in hypertrophied and aged skeletal muscle in vivo by lentivirus delivery. **The journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 3, p. 278–287, 2004.

PALMER, J. P. et al. Is latent autoimmune diabetes in adults distinct from type 1 diabetes or just type 1 diabetes at an older age? **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, n. December, p. S62–67, 2005.

PALMER, R. M. et al. The influence of changes in tension on protein synthesis and prostaglandin release in isolated rabbit muscles. **The Biochemical journal**, v. 214, n. 3, p. 1011–1014, 1983.

PATURI, S. et al. Impaired overload-induced hypertrophy in obese Zucker rat slow-twitch skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 108, n. 1, p. 7–13, 2010.

PEHME, A et al. The effect of mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle. **International journal of sports medicine**, v. 25, n. 5, p. 332–338, 2004.

PETERSON, J. M.; BRYNER, R. W.; ALWAY, S. E. Satellite cell proliferation is reduced in muscles of obese Zucker rats but restored with loading. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 295, n. 2, p. C521–528, 2008.

PETERSON, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873–886, 2009.

PHILIPPOU, A. et al. Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 23, n. 4, p. 567–575, 2009.

PINHEIRO, C. H. D. J. et al. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 7, p. 953–960, 2010.

PINHEIRO, C. H. D. J. et al. Local Injections of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammation and Increase Angiogenesis Ameliorating the Dystrophic Phenotype in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. **Stem cell reviews**, v. 8, n. 2, p. 363–374, 2011.

PINHEIRO, C. H. D. J. et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. **European journal of applied physiology**, v. 112, n. 7, p. 2531–2537, 2012.

PINHEIRO, C. H. J.; VITZEL, K. F.; CURI, R. Effect of N-acetylcysteine on markers of skeletal muscle injury after fatiguing contractile activity. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 22, n. 1, p. 24–33, 2012.

RIBOULET-CHAVEY, A. et al. Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1289–1299, 2006.

RICHTER, J. D.; SONENBERG, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**, v. 433, n. 7025, p. 477–80, 2005.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1009–1013, 2001.

ROSENBLATT, J. D.; PARRY, D. J. Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 73, n. 6, p. 2538–2543, 1992.

ROTWEIN, P. Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 77–81, 1986.

ROY, R. R. et al. Functional significance of compensatory overloaded rat fast muscle. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 52, n. 2, p. 473–478, 1982.

RUSSELL, S. T. et al. Mechanism of induction of muscle protein loss by hyperglycaemia. **Experimental cell research**, v. 315, n. 1, p. 16–25, 2009.

SAKUMA, K. et al. Differential adaptations of insulin-like growth factor-I, basic fibroblast growth factor, and leukemia inhibitory factor in the plantaris muscle of rats by mechanical overloading: an immunohistochemical study. **Acta neuropathologica**, v. 95, n. 2, p. 123–130, 1998.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 23, p. 160–170, 2008.

SANDRI, M. et al. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. **Biogerontology**, 2013.

SARTORELLI, V.; FULCO, M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 244, p. re11, 2004.

SAWADA, Y.; SHEETZ, M. P. Force transduction by Triton cytoskeletons. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 4, p. 609–615, 2002.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS journal**, 2013.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS journal**, v. 280, n. 17, p. 4294–314, 2013.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal muscle**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SCHOENFELD, B. J. Postexercise hypertrophic adaptations: a reexamination of the hormone hypothesis and its applicability to resistance training program design. **Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**, v. 27, n. 6, p. 1720–1730, 2013.

SCHULTHEISS, D. [A brief history of testosterone]. **Der Urologe. Ausg. A**, v. 49, n. 1, p. 51–5, 2010.

SEMSARIAN, C. et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. **Nature**, v. 400, n. 6744, p. 576–81, 1999.

SERRA, C. et al. The role of GH and IGF-I in mediating anabolic effects of testosterone on androgen-responsive muscle. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 193–206, 2011.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 1, p. 4–14, 2010.

SINHA-HIKIM, I. et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 283, n. 1, p. E154–64, 2002.

SINHA-HIKIM, I. et al. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 8, p. 3024–33, 2006.

SITNICK, M.; BODINE, S. C.; RUTLEDGE, J. C. Chronic high fat feeding attenuates load-induced hypertrophy in mice. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 23, p. 5753–65, 2009.

SPANGENBURG, E. E. et al. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 1, p. 283–291, 2008.

STEARNS, S. B.; TEPPERMAN, H. M.; TEPPERMAN, J. Studies on the utilization and mobilization of lipid in skeletal muscles from streptozotocin-diabetic and control rats. **Journal of lipid research**, v. 20, n. 5, p. 654–662, 1979.

STITT, T. N. et al. The IGF-1 / PI3K / Akt Pathway Prevents Short Article Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. v. 14, p. 395–403, 2004.

TATSUMI, R. Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. **Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaihō**, v. 81, n. 1, p. 11–20, 2010.

THOMSON, D. M.; GORDON, S. E. Diminished overload-induced hypertrophy in aged fast-twitch skeletal muscle is associated with AMPK hyperphosphorylation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. 2, p. 557–64, 2005.

THOMSON, D. M.; GORDON, S. E. Impaired overload-induced muscle growth is associated with diminished translational signalling in aged rat fast-twitch skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 574, n. Pt 1, p. 291–305, 2006.

TIMPL, R. et al. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 19, p. 9933–9937, 1979.

TIMSON, B. F. Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 69, n. 6, p. 1935–1945, 1990.

TOMAS, F. M. et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. **The Biochemical journal**, v. 282 (Pt 1, p. 91–7, 1992.

UNGVARI, Z. et al. Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 4, p. 1018–1028, 1999.

VAN AMERONGEN, R.; NUSSE, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 19, p. 3205–3214, 2009.

VANDENBURGH, H. et al. Space travel directly induces skeletal muscle atrophy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 9, p. 1031–1038, 1999.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 557–568, 2008.

VERDIJK, L. B. et al. Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 3, p. 332–339, 2009.

VIERCK, J. et al. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. **Cell Biology International**, v. 24, n. 5, p. 263–272, 2000.

VIGNAUD, A et al. Diabetes provides an unfavorable environment for muscle mass and function after muscle injury in mice. **Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology**, v. 74, n. 5, p. 291–300, 2007.

VINGREN, J. L. et al. Testosterone physiology in resistance exercise and training: the up-stream regulatory elements. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 40, n. 12, p. 1037–1053, 2010.

VON MALTZAHN, J.; BENTZINGER, C. F.; RUDNICKI, M. A. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 186–191, 2012.

WENZLAU, J. M. et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 43, p. 17040–17045, 2007.

WEST, D. W. D.; PHILLIPS, S. M. Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. **The Physician and Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 97–104, 2010.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

WODARZ, A; NUSSE, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 59–88, 1998.

YOON, J.-W.; JUN, H.-S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 580–591, 2005.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

APÊNDICE – Quadros de resultados

Quadro A1 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à massa corporal (g) apresentados na Figura 3A.

Controles									
Ratos	1	2	3	4	5	6	7	8	
Semana 0	292	319	302	214	325	317	283	325	
1	307	340	314	240	360	308	305	350	
2	338	375	343	273	390	341	337	384	
3	362	395	363	327	410	372	355	397	
4	387	417	391	276	439	415	380	424	
5	388	440	392	391	448	420	385	431	
6	413	447	410	413	464	439	406	445	
7	432	472	422	420	486	453	415	457	
8	439	474	432	448	490	481	430	472	
	373,1\pm5,84	408,7\pm6,19	374,3\pm5,18	333,5\pm9,64	423,5\pm6,31	394,0\pm6,89	366,2\pm5,58	409,4\pm5,49	

Diabéticos											
Ratos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Semana 0	250	234	260	300	270	300	300	289	290	280	280
1	253	223	288	282	220	298	288	279	282	287	287
2	256	232	306	295	232	322	303	307	297	308	322
3	250	239	306	309	238	335	307	315	293	308	327
4	261	247	331	306	248	356	306	336	283	321	335
5	259	230	325	301	237	357	312	332	264	315	345
6	257	227	344	304	239	375	309	324	279	305	340
7	248	240	348	304	256	380	310	329	256	316	350
8	253	227	315	297	253	372	322	347	273	360	332
	254,1\pm0,4	233,2\pm0,8	313,6\pm3,0	299,7\pm0,8	243,6\pm1,6	343,8\pm3,5	306,3\pm1,0	317,5\pm2,4	279,7\pm1,4	311,1\pm2,5	342,2\pm2,7

Quadro A2 - Dados individuais e média \pm EPM referentes a glicemia (mg/dL) apresentados na Figura 3B.

Controles								
Ratos	1	2	3	4	5	6	7	8
Semana 0	121	118	123	110	121	108	110	118
2	117	108	104	93	112	108	95	118
4	102	103	88	113	105	105	100	136
5	122	118	100	100	101	101	105	109
6	116	135	119	97	98	102	101	102
7	84	108	97	102	100	99	87	102
8	102	103	95	103	110	107	95	104
	109,1\pm1,9	113,2\pm1,6	1,3,7\pm1,8	102,5\pm0,9	106,7\pm1,1	104,2\pm0,5	99,0\pm1,0	112,7\pm1,7

Diabéticos										
Ratos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Semana 0	386	452	422	404	432	428	474	407	335	253
1	370	405	415	344	299	361	355	399	374	381
2	427	515	518	428	425	485	418	440	467	420
3	515	518	424	523	600	496	448	432	535	416
4	538	585	500	470	577	582	461	505	506	529
5	542	570	505	481	507	533	436	431	557	565
6	569	600	585	600	600	600	600	485	600	578
7	600	600	600	600	600	558	516	453	543	500
8	521	600	600	572	583	561	504	488	570	543
	496,4\pm9,1	538,3\pm7,9	507,6\pm8,4	491,3\pm10	513,6\pm11,9	511,5\pm8,6	468\pm7,6	448,8\pm4,1	498,5\pm10	465\pm11,8

Quadro A3 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao peso úmido (A), seco (B) e razão de aumento (C) do músculo apresentados na Figura 5.

A		Diabético		B		Diabético	
Controle		CL	H	Controle		CL	H
CL	H	CL	H	CL	H	CL	H
40,23	63,9	21,89	48,65	11,63	17,56	5,95	8,11
49,76	73,41	19,75	26,84	13,57	17,73	5,5	7,11
43,66	69,53	26,22	38,22	12,2	17,67	7,33	9,78
44,88	73,66	24,29	30	12,44	19,27	6,9	8,6
56,15	76,5	20,25	34,47	15,13	19	5,75	9,47
40,49	57,25	33,9	43,1	11,22	14,75	9,27	11,43
53,02	87,32	28,25	40	13,95	19,51	7,5	10
46,88\pm2,34	71,65\pm3,61	33,9	39,75	12,87\pm0,52	17,92\pm0,61	9,02	10,25
		25,25	35,5			7,75	10
		31,43	39,49			8,33	10,77
		31,71	36,59			9,27	10
		26,98\pm1,57	37,51\pm1,79			7,50\pm0,41	9,59\pm0,37

C	
Controles	Diabéticos
1,51	1,36
1,31	1,29
1,45	1,33
1,55	1,25
1,26	1,65
1,31	1,23
1,4	1,33
	1,14
	1,29
	1,29
	1,08
1,39\pm0,04	1,29\pm0,04

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

Quadro A4 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao peso úmido (A), seco (B) e razão de aumento (C) do músculo apresentados na Figura 6.

A		Diabético		B		Diabético	
Controle		CL	H	Controle		CL	H
CL	H	CL	H	CL	H	CL	H
39,49	60	34,74	41,89	9,76	18,25	7,11	12,05
37,25	51	32,7	37,03	10	18,5	6,32	9,47
39,74	70,5	26,76	53,33	15	18,14	6,94	8,92
34,36	51,71	28,72	52,89	12,5	16,34	7,57	9,73
37,44	28,97	29,74	58,42	10,5	15,5	4,86	9,44
37,62	66,34	29,25	52,31	10,26	12	6,56\pm0,47	9,92\pm0,54
34,36	59,75	25,25	30	12	13,41		
37,5	66,5	38,42	56,92	9,3	12,38		
36	60,5	13,08	40,53	11,28	11,75		
36,92	54,1	37,69	53,59	11,17\pm0,59	15,14\pm0,93		
38,78	78,75	38,68	57,37				
39,25	78,75	32,43	63,78				
51,19	76,98	37,03	57,89				
47	68,54	31,89	30,75				
35,75	66,5	31,54	53,51				
38,46	53	30,81	51,28				
46,25	57,07	38,11	52,97				
28,14	51,19	29,74	55,75				
44,1	50,75	28,16	51,03				
38,92\pm1,19	60,57\pm2,79	23,68	37,11				
		26,94	37,57				
		30,27	40,81				
		19,73	41,67				
		30,23\pm1,29	48,19\pm1,99				

C	
Controles	Diabéticos
1,87	1,7
1,85	1,5
1,21	1,28
1,31	1,29
1,48	1,94
1,17	
1,12	
1,33	
1,04	
1,37\pm0,10	1,54\pm0,12

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

Quadro A5 - Dados individuais e média \pm EPM referentes às forças tetânica absoluta, específica e isotônica absoluta e suas respectivas razões de aumento (peso final/peso inicial) apresentados na Figura 7.

A		B	
Controle		Diabético	
CL	H	CL	H
3415,3	2935,98	1665,9	2421,29
3415,3	3996,54	987,06	2126,89
4031,82	3871,69	3658,54	4062
3924,02	4410,69	3726,16	3977,04
4632,17	5455,27	1509,89	1589,17
2698,92	5454,88		5083,36
	6644,4	3048,88	3723,51
		3234,59	4542,5
		1768,02	1850,63
		1999,2	4034,27
		2922,65	4881,48
3686,25\pm270,33	4972,24\pm437,45	1985,94\pm283,75	3147,47\pm377,63

B		D	
Controles	Diabéticos	Controles	Diabéticos
1,17	1,45	1,47	1,07
1,13	2,15	1,33	1,74
1,09	1,11	1,55	1,17
1,39	1,07	1,19	1,16
1,18	1,05	1,4	1,49
2,46	1,22	2,06	1,09
	1,4		1,27
	1,05		1,23
	2,02		1,68
	1,67		1,44
	1,08		
1,19\pm0,05	1,25\pm0,08	1,50\pm0,12	1,33\pm0,07

C		D	
Controle		Diabético	
CL	H	CL	H
40,78	59,92	75,72	80,71
51,24	68,31	47	81,8
50,94	79,06	94,47	110,86
55,83	66,51	110,47	128,49
71,78	100,7	44,14	65,65
44,98	92,46	93,09	101,63
		87,42	110,79
		46,27	57,03
		57,12	96,05
		76,91	110,94
52,59\pm4,40	77,82\pm6,52	65,95\pm6,96	88,07\pm7,12

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

E

Controle		Diabético	
CL	H	CL	H
	1396,6	795,27	1160,22
1111,03	1398,46	279,5	969,42
835,74	1016,36	1108,18	1199,72
1061,73	1720,1	1324,57	1558,1
1061,83	1277,23	641,12	955,11
1278,61	1418,35		1470
912,48	2224,31	1181,59	1337,11
1085,13±58,73	1572,50±143,62	832,41	1182,96
		819,38	879,35
		459,62	1467,65
		1138,47	1945,4
		705,06±102,97	1217,96±74,99

F

Controle		Diabético	
CL	H	CL	H
	19,4	36,15	38,67
19,49	17,93	13,31	37,29
16,71	13,37	33,58	27,9
20,82	21,77	45,67	43,28
18	16,81	27,87	26,53
27,8	24,04		30,63
15,21	27,8	39,39	33,43
17,35±0,91	22,18±1,74	22,5	28,85
		26,43	21,98
		13,13	34,94
		29,96	44,21
		29,41±2,01	34,57±1,97

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

Quadro A6 - Dados individuais e média \pm EPM referentes as forças tetânica absoluta, específica e isotônica absoluta e suas respectivas razões de aumento (peso final/peso inicial) apresentados na Figura 8.

A

Controle

CL	H
455,01	3235,96
1375,72	2565,64
1382,29	1423,06
1215,98	1255,87
1353,23	1437,86
806,44	1554,38
357,5	789,29
1283,6	1423,1
1236,21\pm89,78	2451,99\pm488,74

Diabético

CL	H
953,15	1243,82
410,03	1573
681,49	1429,13
663,12	1219,75
440,43	1373,25
973,15	1143,8
681,557\pm156,78	1415,31\pm95,27

B

Controles	Diabéticos
1,86	1,3
1,03	3,84
1,03	2,1
1,06	1,2
1,93	1,9
2,21	1,6
1,52\pm0,22	1,70\pm0,40

C

Controle

CL	H
11,38	44,33
21,84	32,89
22,95	30,56
25,33	31,4
25,33	26,14
20,16	29,89
8,13	16,79
23,12\pm1,00	32,53\pm2,53

Diabético

CL	H
34,55	39,71
16,4	47,67
24,34	39,7
20,3	37,32
17,42	35,15
26,18	40,21
20,37\pm3,97	42,36\pm2,65

D

Controles	Diabéticos
3,9	1,15
1,51	2,91
1,33	1,63
1,24	2,21
1,03	1,6
1,48	2,12
1,79\pm0,37	1,89\pm0,52

E

Controle

CL	H
243,236	1099,462
	284,2
743,33	955,01
374,262	
231,672	778,12
324,968	410,914
483,826	602,21
459,228	825,062
237,65	395,038
438,14\pm70,84	851,97\pm83,79

Diabético

CL	H
331,436	572,418
411,796	802,65
777,728	
534,884	
382,592	
207,172	
356,524	884,94
157,388	351,428
300,37	454,916
342,73\pm17,56	459,58\pm63,83

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

F

Controle		Diabético	
CL	H	CL	H
6,08	15,06	12,28	12,18
		13,73	14,86
11,8	12,24	12,75	26,82
7,49		5,31	24,31
5,52	22,95	9,76	25,92
8,12	8,56	6,3	12,64
10,08	10,95	10,73	
11,48	15,87	11,85±0,71	22,97±2,75
5,4	8,41		
8,65±0,95	14,27±2,05		

CL = Contralateral

H = Hipertrofiado

Quadro A7 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) apresentados na Figura 9.

A

Controle - pata hipertrofiada

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	67,16	73,42	68,66	63,67	60,61	63,47	65,74	62,35	68,13
100	90,24	83,25	80,12	76,82	73,34	71,96	71,03	69,22	66,74
100	76,08	75,9	73,71	72,54	71,67	71,58	70,63	68,59	68,56
100	76,84	79,4	79,47	78,72	78,63	77,16	76,65	75,79	74,84
100	78,35	76,43	76,66	77,89	76,09	76,09	75,33	73,22	72,32
100	95,45	94,53	93,52	93,15	92,48	91,51	90,96	89,64	89,59
100	88,56	88,23	87,48	87,21	87,15	86,53	85,51	85,39	84,44
100\pm0,00	81,81\pm1,41	81,59\pm1,08	79,94\pm1,19	78,57\pm1,37	77,13\pm1,49	76,90\pm1,36	76,55\pm1,27	74,88\pm1,38	74,94\pm1,26

Controle - pata contralateral

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	86,24	86,04	83,56	82,23	81,32	81,28	80,07	77,76	77,7
100	70,96	73,82	73,15	73,98	73,7	68,38	75	73,03	66,57
100	75,86	73,84	73,3	71,64	70,26	70,38	72,05	69,67	70,77
100	80,27	82,91	81,41	81,69	78,04	77,36	76,27	75,98	73,3
100	92,39	90,12	90,29	91,73	89,6	89,64	88,51	86,23	85,14
100	93,7	94,84	95,06	92,77	93,03	93,06	90,78	89,5	89,9
100\pm0,00	83,23\pm1,52	83,59\pm1,43	82,79\pm1,48	82,34\pm1,46	80,99\pm1,48	80,01\pm1,67	80,44\pm1,27	78,69\pm1,28	77,23\pm1,48

B

Contralateral Hipertrofiada

747,3	609,1
665,3	699,4
662,4	665
720,6	710,1
811,1	696,2
837,7	788,3
	836
740,70\pm29,79	714,90\pm28,60

C

Diabéticos - pata hipertrofiada

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	79,17	71,64	78,18	73,48	75,26	77,52	68,74	78	70,43
100	90,94	88,71	84,42	87,32	81,8	80,48	82,82	80,57	74,92
100	76,58	74,99	72,91	71,07	69,18	69,43	70,18	68,84	66,94
100	93,38	93,59	91,37	90,13	87,96	87,8	85,29	83,9	82,57
100	111,14	108,77	103,63	104,85	104,09	102,61	103,83	108,71	102,69
100	91,02	88,84	87,23	84,44	84,89	80,94	79,49	77,6	76,69
100	93,2	91,41	91,17	90,9	87,99	87,84	85,87	85,06	85,75
100	82,55	81,85	80,85	80,24	79,2	78,75	77,87	77,61	76,83
100	93,95	91,95	92,52	92,25	92,07	91,27	90,37	90,46	89,09
100	75,94	77,65	77,21	77,5	77,66	78,08	79,42	78,87	78,81
100	86,53	85,55	81,61	81,83	79,62	77,73	78,9	76,65	77,1
100±0,00	88,58±0,92	86,81±0,93	85,55±0,79	84,91±0,87	83,61±0,85	82,95±0,81	82,07±0,87	82,38±0,93	80,16±0,88

Diabéticos - pata contralateral

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	85,19	86,03	86,01	85,17	86,12	83,86	84,83	83,11	82,1
100	83,59	83,02	82,69	87,11	84,1	80,76	78,32	76,63	81,84
100	79,75	74,63	73,29	72,36	70,43	68,36	67,84	67,23	68,83
100	91,88	91,18	89,51	87,51	87,53	87,31	87,43	86,45	85,79
100	77,46	75,28	77,3	76,75	74,29	72,97	73,34	71,19	72,32
100	83,1	81,74	81,21	79,72	82,13	80,13	80,72	80,68	82,48
100	79,26	79,65	79,22	78,19	77,35	77,71	77,97	77,68	76,53
100	91,1	89,28	88,18	88,03	85,76	85,16	86,61	83,3	83,22
100	89,84	88,97	87,88	87,16	86,25	86,23	81,54	76,33	70,74
100	88,67	88,35	88,82	88,07	90,04	87,32	84,72	87,65	84,41
100±0,00	84,98±0,52	83,81±0,59	83,41±0,55	83,07±0,57	82,40±0,63	80,01±1,67	80,33±0,61	79,02±0,65	78,82±0,61

D

Contralateral Hipertrofiada

771,4	687,2
747,1	764,5
658,3	656,7
801,7	804,7
684,7	762,8
740,7	806,3
715,3	829,4
789	727,3
769,6	711,7
795,8	737
747,40±15,29	748,80±17,52

Quadro A8 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) apresentados na Figura 10.

A

Diabéticos

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	79,17	71,64	78,18	73,48	75,26	77,52	68,74	78	70,43
100	90,94	88,71	84,42	87,32	81,8	80,48	82,82	80,57	74,92
100	76,58	74,99	72,91	71,07	69,18	69,43	70,18	68,84	66,94
100	93,38	93,59	91,37	90,13	87,96	87,8	85,29	83,9	82,57
100	111,14	108,77	103,63	104,85	104,09	102,61	103,83	108,71	102,69
100	91,02	88,84	87,23	84,44	84,89	80,94	79,49	77,6	76,69
100	93,2	91,41	91,17	90,9	87,99	87,84	85,87	85,06	85,75
100	82,55	81,85	80,85	80,24	79,2	78,75	77,87	77,61	76,83
100	93,95	91,95	92,52	92,25	92,07	91,27	90,37	90,46	89,09
100	75,94	77,65	77,21	77,5	77,66	78,08	79,42	78,87	78,81
100	86,53	85,55	81,61	81,83	79,62	77,73	78,9	76,65	77,1
100\pm0,00	88,58\pm0,92	86,81\pm0,93	85,55\pm0,79	84,91\pm0,87	83,61\pm0,85	82,95\pm0,81	82,07\pm0,87	82,38\pm0,93	80,16\pm0,88

Controles

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	67,16	73,42	68,66	63,67	60,61	63,47	65,74	62,35	68,13
100	90,24	83,25	80,12	76,82	73,34	71,96	71,03	69,22	66,74
100	76,08	75,9	73,71	72,54	71,67	71,58	70,63	68,59	68,56
100	76,84	79,4	79,47	78,72	78,63	77,16	76,65	75,79	74,84
100	78,35	76,43	76,66	77,89	76,09	76,09	75,33	73,22	72,32
100	95,45	94,53	93,52	93,15	92,48	91,51	90,96	89,64	89,59
100	88,56	88,23	87,48	87,21	87,15	86,53	85,51	85,39	84,44
100\pm0,00	81,81\pm1,41	81,59\pm1,08	79,94\pm1,19	78,57\pm1,36	77,13\pm1,49	76,90\pm1,35	76,55\pm1,26	74,88\pm1,38	74,94\pm1,25

B

Controles Diabéticos

609,1	687,2
699,4	764,5
665	656,7
710,1	804,7
696,2	762,8
788,3	806,3
836	829,4
	727,3
	711,7
	737
676,00\pm18,32	748,80\pm17,52

C

Diabéticos

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	85,19	86,03	86,01	85,17	86,12	83,86	84,83	83,11	82,1
100	83,59	83,02	82,69	87,11	84,1	80,76	78,32	76,63	81,84
100	79,75	74,63	73,29	72,36	70,43	68,36	67,84	67,23	68,83
100	91,88	91,18	89,51	87,51	87,53	87,31	87,43	86,45	85,79
100	77,46	75,28	77,3	76,75	74,29	72,97	73,34	71,19	72,32
100	83,1	81,74	81,21	79,72	82,13	80,13	80,72	80,68	82,48
100	79,26	79,65	79,22	78,19	77,35	77,71	77,97	77,68	76,53
100	91,1	89,28	88,18	88,03	85,76	85,16	86,61	83,3	83,22
100	89,84	88,97	87,88	87,16	86,25	86,23	81,54	76,33	70,74
100	88,67	88,35	88,82	88,07	90,04	87,32	84,72	87,65	84,41
100±0,00	84,98±0,52	83,81±0,59	83,41±0,55	83,00±0,57	82,40±0,63	80,98±0,63	80,33±0,61	79,02±0,65	78,82±0,61

Controles

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	86,24	86,04	83,56	82,23	81,32	81,28	80,07	77,76	77,7
100	70,96	73,82	73,15	73,98	73,7	68,38	75	73,03	66,57
100	75,86	73,84	73,3	71,64	70,26	70,38	72,05	69,67	70,77
100	80,27	82,91	81,41	81,69	78,04	77,36	76,27	75,98	73,3
100	92,39	90,12	90,29	91,73	89,6	89,64	88,51	86,23	85,14
100	93,7	94,84	95,06	92,77	93,03	93,06	90,78	89,5	89,9
100±0,00	83,23±1,52	83,89±1,42	82,79±1,47	82,34±1,45	80,99±1,48	80,01±1,66	80,44±1,26	78,69±1,28	77,23±1,47

D

Controles Diabéticos

747,3	771,4
665,3	747,1
662,4	658,3
720,6	801,7
811,1	684,7
837,7	740,7
	715,3
	789
	769,6
	795,8
740,70±29,79	747,40±15,29

Quadro A9 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) apresentados na Figura 11.

A

Controle - pata hipertrofiada

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	87,83	87,64	85,96	83,36	84,85	82,54	81,35	79,06	78,64
100	90,19	88,16	86,86	86,38	85,07	82,99	82,97	81,65	82,43
100	90,08	89,75	89,88	89	89,1	87,18	88,97	87,21	81,46
100	86,11	85,15	86,79	86,26	85,41	85,3	84,77	84,65	83,34
100	96,1	93,82	97,6	93,42	91,28	91,69	92,31	92,14	89,1
100	80,76	84,5	84,71	85,42	83,09	83,22	83,12	83,36	81,84
100	92,76	87,82	86,76	86,29	86,35	85,62	80,75	78,83	79,35
100\pm0,00	89,11\pm0,70	88,12\pm0,44	88,36\pm0,62	87,16\pm0,46	86,45\pm0,40	85,50\pm0,45	84,89\pm0,60	83,84\pm0,67	82,30\pm0,48

Controles

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	92,74	87,85	86,73	82,75	84,99	83,87	81,03	78,68	78,57
100	73,27	82,31	79,41	68,96	78,03	75,59	78,29	84,44	80,42
100	84,06	89,73	90,36	91,26	91,55	89,85	91,62	90,32	89,91
100	79,27	77,04	79,08	78,23	75,68	74,65	73,72	75,22	74,72
100	81,55	81,16	80,57	80,23	78,42	78,08	77,92	78,36	76,77
100	84,46	82,9	81,18	78,42	77,76	76,63	72,2	74,37	72,66
100	99,23	70,12	71,08	81,3	58,72	53,65	69,63	52,71	65,6
100\pm0,00	84,94\pm1,23	81,58\pm0,94	81,20\pm0,87	80,16\pm0,94	77,87\pm1,44	76,04\pm1,60	77,77\pm1,03	76,30\pm1,68	76,95\pm1,06

B

Contralateral Hipertrofiada

767,9	761,9
710,5	775,5
813,7	801,9
700,3	776,1
724,7	842,9
714,3	759,1
639,2	774,9
724,40\pm20,70	784,60\pm11,03

C

Diabéticos - pata hipertrofiada

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	66,61	61,22	71,8	71,76	63,04	67,81	71,45	67,13	63,4
100	89,1	88,91	84,77	83,09	81,18	80,55	78,17	77,76	76,67
100	80,34	79,63	78,63	78,22	78,92	75,24	77,6	77,83	70,9
100	81,64	84,47	78	78,95	78,36	79,43	78,88	78,1	77,25
100±0,00	79,42±2,34	78,55±3,04	78,30±1,32	78,00±1,17	75,37±2,07	75,75±1,44	76,52±0,85	75,20±1,34	72,05±1,61

Diabéticos - pata contralateral

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	82,9	85,87	89,68	87,87	86,41	89,63	86,61	89,14	87,19
100	90,98	97,62	97,82	96,82	98,6	96,82	97,27	94,89	92,48
100	100,62	88,88	89,99	86,73	86,93	87	87,89	88,29	82,3
100	82,61	84,44	89,2	91,67	92,39	92,79	90,96	93,18	93,18
100	69,83	70,98	72,25	71,64	71,13	69,06	68,44	65,96	68,37
100	78,03	76,05	74,05	73,18	73,11	69,29	66,63	58,92	65,3
100	79,26	69,31	71,94	71,95	70,81	70,12	70,68	72,2	70,47
100	82,28	81,5	78,81	79,78	77,38	76,4	73,03	72,25	72,12
100	77,87	83,3	83,76	85,48	84,96	87,47	86,4	84,55	83,98
100±0,00	82,70±0,97	81,99±0,98	83,05±1,03	82,79±1,01	82,41±1,09	82,06±1,21	80,87±1,24	79,93±1,43	79,48±1,18

D

Contralateral Hipertrofiada

791,7	622,5
867,1	751,9
807,5	711,9
813,8	726,5
707,5	
765,8	
792,20±21,74	703,20±28,14

Quadro A10 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à Força (% em relação ao inicial) apresentados na Figura 12.

A

Controles

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	87,83	87,64	85,96	83,36	84,85	82,54	81,35	79,06	78,64
100	90,19	88,16	86,86	86,38	85,07	82,99	82,97	81,65	82,43
100	90,08	89,75	89,88	89	89,1	87,18	88,97	87,21	81,46
100	86,11	85,15	86,79	86,26	85,41	85,3	84,77	84,65	83,34
100	96,1	93,82	97,6	93,42	91,28	91,69	92,31	92,14	89,1
100	80,76	84,5	84,71	85,42	83,09	83,22	83,12	83,36	81,84
100	92,76	87,82	86,76	86,29	86,35	85,62	80,75	78,83	79,35
100\pm0,00	89,11\pm0,70	88,12\pm0,44	88,36\pm0,62	87,16\pm0,46	86,45\pm0,40	85,50\pm0,45	84,89\pm0,60	83,84\pm0,67	82,30\pm0,48

Diabéticos

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	66,61	61,22	71,8	71,76	63,04	67,81	71,45	67,13	63,4
100	89,1	88,91	84,77	83,09	81,18	80,55	78,17	77,76	76,67
100	80,34	79,63	78,63	78,22	78,92	75,24	77,6	77,83	70,9
100	81,64	84,47	78	78,95	78,36	79,43	78,88	78,1	77,25
100\pm0,00	79,42\pm1,33	78,55\pm1,73	78,30\pm0,75	78,00\pm0,66	75,37\pm1,18	75,75\pm0,82	76,52\pm0,48	75,20\pm0,76	72,05\pm0,92

B

Controle Daibético

761,9	622,5
775,5	751,9
801,9	711,9
776,1	726,5
842,9	
759,1	
774,9	
784,60\pm11,03	703,20\pm28,14

C

Controles

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	92,74	87,85	86,73	82,75	84,99	83,87	81,03	78,68	78,57
100	73,27	82,31	79,41	68,96	78,03	75,59	78,29	84,44	80,42
100	84,06	89,73	90,36	91,26	91,55	89,85	91,62	90,32	89,91
100	79,27	77,04	79,08	78,23	75,68	74,65	73,72	75,22	74,72
100	81,55	81,16	80,57	80,23	78,42	78,08	77,92	78,36	76,77
100	84,46	82,9	81,18	78,42	77,76	76,63	72,2	74,37	72,66
100	99,23	70,12	71,08	81,3	58,72	53,65	69,63	52,71	65,6
100±0,00	84,94±1,23	81,58±0,94	81,20±0,87	80,16±0,94	77,87±1,44	76,04±1,60	77,77±1,03	76,30±1,68	76,95±1,06

Diabéticos

Contrações

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	82,9	85,87	89,68	87,87	86,41	89,63	86,61	89,14	87,19
100	90,98	97,62	97,82	96,82	98,6	96,82	97,27	94,89	92,48
100	100,62	88,88	89,99	86,73	86,93	87	87,89	88,29	82,3
100	82,61	84,44	89,2	91,67	92,39	92,79	90,96	93,18	93,18
100	69,83	70,98	72,25	71,64	71,13	69,06	68,44	65,96	68,37
100	78,03	76,05	74,05	73,18	73,11	69,29	66,63	58,92	65,3
100	79,26	69,31	71,94	71,95	70,81	70,12	70,68	72,2	70,47
100	82,28	81,5	78,81	79,78	77,38	76,4	73,03	72,25	72,12
100	77,87	83,3	83,76	85,48	84,96	87,47	86,4	84,55	83,98
100±0,00	82,70±0,97	81,99±0,98	83,05±1,03	82,79±1,01	82,41±1,09	82,06±1,21	80,87±1,24	79,93±1,43	79,48±1,18

D

Controle Diabético

767,9	791,7
710,5	867,1
813,7	807,5
700,3	813,8
724,7	643,5
714,3	651,9
639,2	661,5
	707,5
	765,8
724,40±20,70	745,60±27,26

Quadro A11 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 14.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,17	0,25	0,09	0,40
0,06	0,21	0,03	0,32
0,20	0,75	0,29	0,66
0,14	0,32	0,00	0,41
0,39	0,61	0,20	0,42
0,05	0,82	0,04	0,11
0,17\pm0,05	0,62\pm0,11	0,10\pm0,04	0,43\pm0,05

Quadro A12 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 15.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,44	0,49	0,26	0,86
0,19	0,30	0,18	0,40
0,14	0,95		0,87
0,08	0,74	0,58	0,88
0,27	0,84	0,57	0,72
0,19	1,06	0,19	0,31
0,17\pm0,03	0,81\pm0,09	0,35\pm0,09	0,74\pm0,09

Quadro A13 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 16.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,63	0,53	0,77	0,97
0,19	0,38	0,20	0,27
1,02	0,71	0,52	0,86
0,38	0,44	0,32	0,43
0,79	0,77	0,80	0,90
1,10	1,25	0,62	0,92
0,78\pm0,13	0,81\pm0,15	0,67\pm0,06	0,91\pm0,02

Quadro A14 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 17.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,56	0,20	0,53	0,63
0,21	0,44	0,62	0,80
1,04	0,81	0,27	0,91
0,91	0,66	0,83	0,84
0,16	0,56	0,54	0,62
0,64	0,56	0,50	0,70
0,30\pm0,12	0,64\pm0,05	0,49\pm0,06	0,75\pm0,04

Quadro A15 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 18.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,64	0,83	1,20	1,76
0,95	1,15	0,95	0,94
1,20	1,11	1,05	0,91
0,86	0,96	0,90	1,02
0,90	1,16	1,31	2,17
0,92	1,04	0,83	0,90
0,91\pm0,07	1,04\pm0,05	1,04\pm0,07	1,28\pm0,22

Quadro A16 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 19.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,98	0,83	1,34	2,56
0,76	0,93	0,74	0,69
0,96	1,56	0,41	0,34
0,92	1,16	0,61	0,57
0,75	0,92	0,70	1,31
0,74	0,73	0,36	0,34
0,85\pm0,04	0,91\pm0,07	0,69\pm0,14	0,65\pm0,17

Quadro A17 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 20.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,17	1,06	1,68	2,48
0,75	0,92	0,70	0,78
0,66	0,58	0,49	0,64
0,65	0,67	0,43	0,60
0,87	0,83	1,08	1,77
0,89	1,12		
0,76\pm0,05	0,92\pm0,08	0,67\pm0,14	0,94\pm0,27

Quadro A18 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no EDL apresentados na Figura 21.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,92	0,92	1,25	1,77
0,97	0,91	0,72	0,81
1,20	1,12	1,05	0,96
0,89	0,83	0,80	0,78
0,88	0,89	1,04	1,67
1,00	1,03	0,83	1,05
0,97\pm0,04	0,95\pm0,04	0,95\pm0,08	1,05\pm0,16

Quadro A19 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 22.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,03	0,12	0,02	0,16
0,07	0,12	0,06	0,28
0,09	0,18	0,23	0,16
0,15	0,64	0,13	0,02
0,27	1,02	0,18	0,13
0,05	0,20	0,18	0,07
0,05\pm0,01	0,15\pm0,02	0,11\pm0,03	0,18\pm0,03

Quadro A20 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 fosforilada (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 23.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,06	0,43	0,08	0,28
0,11	0,78	0,08	0,96
0,08	0,39	0,08	0,21
0,08	0,59	0,07	0,15
0,28	0,71	0,11	0,34
0,02	0,53	0,06	0,18
0,12\pm0,04	0,57\pm0,06	0,08\pm0,00	0,23\pm0,03

Quadro A21 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 24.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,18	0,58	0,41	0,63
0,12	0,16	0,09	0,55
0,12	0,48	0,12	0,60
0,27	0,72	0,27	0,64
0,28	0,90	0,10	0,47
0,20	0,34	0,41	0,94
0,19\pm0,02	0,53\pm0,10	0,23\pm0,06	0,63\pm0,06

Quadro A22 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt fosforilada (Relativo ao controle) no sóleo apresentados na Figura 25.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,13	0,35	0,43	0,45
0,25	0,40	0,24	0,61
0,22	0,60	0,11	0,55
0,16	0,26	0,11	0,36
0,19	0,57	0,23	0,48
0,23	0,43	0,19	0,88
0,19\pm0,01	0,43\pm0,05	0,21\pm0,04	0,55\pm0,07

Quadro A23- Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 26.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,72	1,20	0,42	0,99
0,63	1,80	0,35	0,57
1,74	0,80	0,21	1,25
0,61	1,12	0,00	0,30
0,64	0,56	0,18	0,83
0,73	1,17	0,28	0,92
0,66\pm0,02	0,96\pm0,12	0,28\pm0,04	0,91\pm0,11

Quadro A24 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de S6 fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 27.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,68	0,80	0,60	0,79
1,36	2,18	1,03	1,92
1,06	1,18	0,16	0,94
1,01	0,90	0,00	1,03
0,73	0,79	0,27	0,49
1,88	1,31	0,48	0,43
0,96\pm0,12	0,99\pm0,10	0,50\pm0,15	0,73\pm0,12

Quadro A25 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt total (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 28.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,16	0,44	0,14	0,35
0,13	0,49	0,05	0,21
0,14	0,99	0,14	0,49
0,36	0,59	0,00	0,50
0,34	0,54	0,10	0,43
0,10	0,47	0,40	0,56
0,20\pm0,04	0,50\pm0,02	0,16\pm0,06	0,42\pm0,05

Quadro A26 - Dados individuais e média \pm EPM referentes ao conteúdo de Akt fosforilada (Relativo à quantidade de proteína utilizada) no sóleo apresentados na Figura 29.

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,30	0,59	0,34	0,77
0,42	0,71	0,36	0,55
0,32	1,01	0,24	0,65
0,21	0,45	0,00	0,44
0,72	0,66	0,23	0,49
0,48	0,51	0,34	0,53
0,40\pm0,07	0,58\pm0,04	0,30\pm0,02	0,53\pm0,03

Quadro A27 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à expressão gênica por RT-PCR no músculo EDL apresentados na Tabela 2.

FAK

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,62	3,31	0,49	0,64
1,00	1,31	1,05	1,12
0,88	2,01	1,29	1,10
0,70	1,74	1,25	1,54
	4,36	1,11	2,03
	1,97		
1,05 \pm 0,20	2,45 \pm 0,47	1,03 \pm 0,14	1,28 \pm 0,23

Wnt 7a

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,64	0,75	0,66	0,23
0,66	0,54	1,18	0,69
0,32	0,48	0,66	0,17
1,81	0,23	0,29	0,66
0,78	0,96	0,69	
	0,17		
1,04 \pm 0,29	0,52 \pm 0,12	0,69 \pm 0,14	0,43 \pm 0,13

MuRF-1

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,88	0,34	0,35	0,38
0,67	0,18	0,52	0,40
0,70	0,61	0,53	0,46
0,56	0,27	0,53	0,41
	0,59	0,57	0,33
			0,41
0,70 \pm 0,06	0,39 \pm 0,08	0,50 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01

Atrogina-1

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,37	0,74	0,52	0,31
0,46	0,23	0,58	0,31
0,59	0,06	0,53	0,63
2,02	0,24	0,45	0,40
0,57	0,24	1,19	0,31
	0,42	0,99	
1,00 ± 0,30	0,32 ± 0,09	0,71 ± 0,12	0,39 ± 0,06

IGF-1 Eb

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,87	12,25	0,21	1,31
0,92	9,68	0,27	1,80
0,63	7,86	0,24	3,52
1,82	14,07	1,30	2,86
0,51	5,22	0,67	5,64
		0,67	6,04
0,95 ± 0,23	9,81 ± 1,56	0,56 ± 0,17	3,52 ± 0,79

Miostatina

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,66	0,57	0,68	0,11
0,59	0,17	0,63	0,32
0,97	0,25	0,65	0,50
0,45	0,15	0,76	0,52
	0,17	0,51	0,20
	0,52		0,33
0,66 ± 0,11	0,30 ± 0,07	0,64 ± 0,04	0,33 ± 0,06

Folistatina

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,02	1,86	0,90	1,31
0,49	1,40	0,72	0,76
0,71	1,25	1,12	1,44
1,78	0,66	0,61	0,69
0,61	1,44	0,92	1,26
	0,74	1,65	1,98
0,92 ± 0,23	1,22 ± 0,18	0,98 ± 0,15	1,24 ± 0,19

Ankrd2

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,76	0,91	0,93	1,19
2,21	0,41	0,46	0,96
1,03	0,94	0,64	1,83
0,63	0,12	0,45	1,87
0,19		0,28	
0,76	0,91	0,93	1,19
0,96 ± 0,34	0,59 ± 0,20	0,55 ± 0,11	1,46 ± 0,22

Axina2

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,97	0,55	0,45	0,45
0,63	0,37	0,71	0,36
0,48	0,67	0,50	0,59
1,96	0,52	0,94	0,41
0,78	0,57	1,01	0,35
			0,66
0,96 ± 0,26	0,53 ± 0,04	0,72 ± 0,11	0,47 ± 0,05

Quadro A28 - Dados individuais e média \pm EPM referentes à expressão gênica por RT-PCR no músculo sóleo apresentados na Tabela 3.

FAK

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,14	1,57	1,78	2,03
0,86	2,33	1,41	2,46
1,34	1,81	1,21	2,43
0,91	1,76	0,86	2,19
0,89	1,85	1,04	
0,93	1,81	0,97	
1,01 \pm 0,07	1,85 \pm 0,10	1,21 \pm 0,13	2,27 \pm 0,10

Wnt 7a

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,21	0,05	0,41	0,08
0,16	0,21	0,29	0,37
0,45	0,15	0,57	0,06
0,28	0,26	0,56	0,47
0,48	0,12	0,27	0,16
		0,35	0,30
0,31 \pm 0,06	0,15 \pm 0,03	0,40 \pm 0,05	0,24 \pm 0,06

MuRF-1

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,10	0,35	0,83	0,23
0,73	0,33	1,11	0,23
1,36	0,78	1,24	0,80
0,59	0,24	0,74	0,47
1,35	0,37	0,95	0,33
1,15	0,36	0,59	0,23
1,04 \pm 0,13	0,40 \pm 0,07	0,91 \pm 0,09	0,38 \pm 0,09

Atrogina-1

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,10	0,28	1,18	0,20
0,87	0,24	1,55	0,42
1,26	0,59	1,79	0,96
0,74	0,15	0,97	0,42
1,29	0,38	1,42	0,31
0,87	0,34	0,46	0,26
1,02 ± 0,09	0,33 ± 0,06	1,22 ± 0,19	0,42 ± 0,11

IGF-1 Eb

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,58	15,60	1,17	42,32
1,30	18,81	0,36	45,68
0,30	31,41	0,41	7,13
0,99	42,32	0,35	34,62
1,79	13,67	0,38	6,60
		0,47	
0,99 ± 0,26	24,36 ± 5,45	0,52 ± 0,13	27,27 ± 8,52

Miostatina

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
0,68	0,20	1,23	0,48
0,53	0,24	0,53	0,22
0,60	0,60	0,38	0,18
1,70	0,45	0,99	0,64
1,18	0,44		0,08
	0,30		
0,93 ± 0,22	0,37 ± 0,06	0,91 ± 0,20	0,32 ± 0,10

Folistatina

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,39	0,85	0,79	1,58
0,83	1,21	0,75	1,39
1,07	0,89	0,39	1,22
0,69	1,43	0,66	0,70
0,77	0,80	0,47	1,21
1,53	1,01		0,48
1,04 ± 0,14	1,03 ± 0,10	0,61 ± 0,07	1,09 ± 0,17

Ankrd2

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,57	0,41	0,51	0,33
0,86	0,61	0,82	0,14
0,71	0,94	0,39	0,82
0,73	0,23	0,47	0,49
0,87	0,37	0,57	0,39
1,65	0,57	0,61	0,39
1,06 ± 0,17	0,52 ± 0,10	0,56 ± 0,06	0,42 ± 0,09

Axina2

Controle Contralateral	Controle Hipertrofiado	Diabético Contralateral	Diabético Hipertrofiado
1,18	0,81	1,54	1,17
0,63	1,22	1,61	1,55
0,73	0,95	1,30	1,42
1,13	0,83	1,42	1,53
1,34	0,86	1,71	
	0,76	0,95	
1,03 ± 0,18	0,84 ± 0,03	1,42 ± 0,11	1,41 ± 0,08