MÁRIO ALVES DE SIQUEIRA FILHO

**Envelhecimento e músculo esquelético: força muscular,
atividade proteassomal e sinalização relacionada ao
balanço proteico**

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

São Paulo
2012

MÁRIO ALVES DE SIQUEIRA FILHO

**Envelhecimento e músculo esquelético: força muscular,
atividade proteassomal e sinalização relacionada ao
balanço proteico**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Siqueira Filho, Mário Alves de.

Envelhecimento e músculo esquelético: força muscular, atividade proteassomal e sinalização relacionada ao balanço proteico / Mário Alves de Siqueira Filho. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Sinalização intracelular.

Versão do título para o inglês: Aging and skeletal muscle: muscle strength, proteasome activity and signaling related protein balance.

1. Atrofia muscular 2. Força muscular 3. Envelhecimento
4. Ratos wistar 5. Proteólise força muscular, atividade proteassomal e sinalização relacionada ao balanço proteico 6. Terapia da reposição hormonal I. Carvalho, Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0216/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mário Alves de Siqueira Filho.

Título da Tese: Envelhecimento e músculo esquelético: força muscular, atividade proteossomal e sinalização relacionada ao balanço proteico.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.028/2006

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 051/05/CEEA, aprovo a inclusão do aluno Mário Alves de Siqueira Filho ao protocolo intitulado: ***"Desidroepiandrosterona e ação insulínica: regulação da secreção de insulina das etapas iniciais da ação insulínica, do fator de transcricional PDX-1 e da expressão do GLUT2, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos"***, para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. Carla Roberta Oliveira de Carvalho, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 23 de agosto de 2006.

Atenciosamente,

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice- Coordenador da CEEA- ICB/USP

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DE PROTOCOLO - CEEA

Ao

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Solicito à Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB/USP a renovação do protocolo nº 051/05, aprovado em 02/06/2005, intitulado **Desidroepiandrosterona e ação insulínica: regulação da secreção de insulina das etapas iniciais da ação insulínica, do fator de transcrional PDX-1 e da expressão do GLUT2, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos** sob minha responsabilidade.

Declaro que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas inicialmente para esta presente solicitação.

São Paulo, 29/04/2009.

Prof(a). Dr(a).....

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 **014** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carla Roberta de Oliveira Carvalho**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da desidroepiandrosterona (DHEA) na sinalização intracelular*" do qual participam o(s) aluno(s) **Mário Alves de Siqueira Filho, Felipe Natali Almeida, Vitor Felitti, Caio Jordão Teixeira**, 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 **07.03.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de março de 2012.

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

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

Dedico este trabalho à minha maravilhosa família, meus pais Mário e Tereza; minhas irmãs Fernanda e Carla... pessoas sem as quais minhas conquistas não seriam possíveis e não teriam tamanha importância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço expressivamente...

Aos meus pais e minhas irmãs pela constante força, carinho, compreensão, credibilidade e motivação, sem os quais não haveria motivos suficientes para continuar esta jornada;

À Profa. Carla Roberta pela inestimável contribuição em minha formação profissional, pelo exemplo de pessoa, pela forma em que critica, e pela grandiosa maneira como consegue motivar;

À Cinthya Walter por ser tão importante em momentos decisivos, quando precisei de tranquilidade, de motivação, de críticas e sugestões e por servir de exemplo na maneira de lidar com o compromisso acadêmico;

Ao amigo Ricardo Zanuto por simbolizar o início de minha carreira acadêmica e por quem cultivo enorme admiração;

Aos colegas de laboratório: Teca, Karina, Vitor Felitti, Katherine, Gabriela, João Paulo, Nelo Zanchi... por serem fundamentais para que eu chegasse até aqui;

Aos Professores Silvana Bordin, Maria Tereza, Ângelo Carpinelli, Rui Curi, Fábio Bessa, Luiz Roberto de Britto e colaboradores de seus laboratórios;

Aos colegas que me acolheram e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão desta fase de minha formação profissional;

Ao apoio financeiro do CNPq.

RESUMO

Siqueira Filho MA. Envelhecimento e músculo esquelético: força muscular, atividade proteassomal e sinalização relacionada ao balanço proteico. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A sarcopenia é definida como a perda de massa e de função musculares que ocorre com o envelhecimento. A massa muscular é mantida como resultado do constante balanço entre síntese e degradação proteicas e com o avanço da idade, ocorrem alterações das fibras musculares que têm seu diâmetro reduzido, mudanças na proporção dos diferentes tipos de fibras e redução de proteínas contráteis. Para caracterizar a sarcopenia em ratos Wistar em diferentes idades foram medidas força voluntária máxima, atividade proteassomal e expressão total de Akt 1, p70S6K, MuRF 1 e Atrogina 1 em músculos Sóleo e EDL. Caracterizamos pela primeira vez a sarcopenia em ratos com 13 meses de idade a partir de reduzida massa tecidual dos músculos Sóleo e EDL e de força voluntária máxima avaliada por protocolo de teste de força com uso de escada. A atividade catalítica do proteassoma exibe padrão distinto de acordo com o músculo avaliado e a idade dos animais.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sarcopenia. Proteassoma. Atrofia. Força muscular. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Siqueira Filho, MA. Aging and skeletal muscle: muscle strength, proteasome activity and signaling related protein balance. [Tesis (PhD. Human Physiology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo; 2012.

The sarcopenia is defined as the mass and muscle function loss that occurs with the ageing. The muscle mass is maintained as result of the constant balance between synthesis and protein degradation and with the advance of age, occur changes of muscle fibers that has its diameter reduced, changes in the proportion of different types of fibers and reduction of contractile protein. To characterize the sarcopenia in Wistar rats in different ages were measured maximum volunteered strength, proteasome activity and total expression of Akt 1, p70S6K, MuRF 1 and Atrogin 1 in Soleus and EDL muscle. For the first time we characterized the sarcopenia in 13 months old rats from the reduced tissue mass of Soleus and EDL muscle and of maximum volunteered strength analyzed by a protocol ladder climbing test. The catalytic activity of proteasome show a distinct pattern according to the analyzed muscle and the animals' age.

Keywords: Aging. Sarcopenia. Proteasoma. Atrophy. Muscle strength. Skeletal muscle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt 1	Proteína quinase B isoforma 1
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Bovine serum albumin
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHEA-S	Desidroepiandrosterona sulfatada
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sistema de detecção de quimioluminescência (Enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
IGF 1	Fator 1 de crescimento semelhante à insulina
Kitt	Constante de decaimento da glicose
MAPK	Proteína quinase ativadora da mitogênese
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Foxo1	Fator de transcrição 1 da família FoxO
Foxo 3a	Fator de transcrição 3a da família FoxO
MAFbx	Muscle atrophy F box
MuRF1	Muscle RING finger 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Sódio dodecil-sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
p70S6K	Proteína ribossomal S6
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores relacionados à sarcopenia.....	17
Figura 2 – Mecanismos de síntese e degradação proteicas no músculo esquelético.....	19
Figura 3 – Representação do esquema de tratamento dos animais e sua alteração.....	25
Figura 4 – Aparato para teste de força voluntária máxima.....	27
Figura 5 – Glicemias de jejum e sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (<i>Kitt</i>) em ratos com 2, 6 e 13 meses.....	34
Figura 6 – Glicemias de jejum e teste e sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (<i>Kitt</i>) em ratos com 2 e 24 meses.....	35
Figura 7 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) em ratos com 2, 6 e 13 meses.....	36
Figura 8 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) em ratos com 2 e 24 meses.....	36
Figura 9 – Representação da força voluntária máxima de ratos com 2, 6 e 13 meses.....	37
Figura 10 – Representação da força voluntária máxima de ratos com 2 e 24 meses.....	38
Figura 11 – Concentrações séricas de lactato frente ao teste de força voluntária máxima.	39
Figura 12 – Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo EDL.....	40
Figura 13 – Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo Sóleo.....	41
Figura 14 – Expressão total de MuRF 1 no músculo EDL.....	42
Figura 15 – Expressão total de Atrogina 1 no músculo EDL.....	43
Figura 16 – Expressão total de Akt 1 no músculo EDL.....	44
Figura 17 – Expressão total de p70S6K no músculo EDL.....	45
Figura 18 – Expressão total de MuRF 1 no músculo Sóleo.....	46
Figura 19 – Expressão total de Atrogina 1 no músculo Sóleo.....	47

Figura 20 – Expressão total de Akt 1 no músculo Sóleo.....	48
Figura 21 – Expressão total de p70S6K no músculo Sóleo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa corporal e massas relativas de tecidos musculares e adiposos dos animais tratados com óleo mineral (veíc.) ou hormônio dissolvido em óleo mineral (DHEA) em diferentes idades.....	33
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Materiais.....	26
3.3 Métodos.....	26
3.3.1 Administração de DHEA.....	26
3.3.2 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal curto para determinação da constante de decaimento da glicose (K_{itt}).....	27
3.3.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT).....	28
3.3.4 Teste da força voluntária máxima.....	28
3.3.4.1 Alterações (ajustes) do protocolo.....	30
3.3.4.2 Dosagem de lactato circulante.....	30
3.3.5 Atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina.....	31
3.3.6 Extração de proteínas totais dos músculos esqueléticos e <i>Immunoblotting</i>	31
3.3.7 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Características zoométricas.....	34
4.2 Homeostase glicêmica.....	36
4.3 Análise da força voluntária máxima.....	39
4.4 Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma.....	41
4.4.1 Músculo EDL.....	41

4.4.2 Músculo Sóleo.....	42
4.5 Immunoblotting das proteínas MuRF 1, Atrogina 1, Akt 1 e p70S6K	43
4.5.1 Músculo EDL.....	43
4.5.1.1 <i>Expressão tecidual de MuRF 1</i>	43
4.5.1.2 <i>Expressão total de Atrogina 1</i>	45
4.5.1.3 <i>Expressão total de Akt 1</i>	46
4.5.1.4 <i>Expressão total de p70S6K</i>	47
4.5.2 Músculo Sóleo.....	48
4.5.2.1 <i>Expressão total de MuRF 1</i>	48
4.5.2.2 <i>Expressão total de Atrogina 1</i>	49
4.5.2.3 <i>Expressão total de Akt 1</i>	50
4.5.2.4 <i>Expressão total de p70S6K</i>	51
5 DISCUSSÃO.....	52
5.1 A sarcopenia sob o aspecto do músculo EDL.....	54
5.2 A sarcopenia sob o aspecto do músculo Sóleo.....	56
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A sarcopenia é definida como a perda de massa e de função musculares que ocorre com o envelhecimento¹. Uma vez que a massa muscular esquelética representa um determinante para força, resistência e desempenho físico², o declínio dessa massa tecidual está associado a reduções da força, capacidade aeróbica e taxa metabólica que contribuem para menor funcionalidade e autonomia das pessoas, aumento do risco de quedas e do tempo de internações, fatores que em conjunto podem comprometer a qualidade de vida com o avanço da idade³. Prevenir e tratar a sarcopenia é um desafio global na atualidade. Nos últimos 20 anos muitos estudos tem contribuído para o esclarecimento dos possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia multifatorial da redução de massa muscular associada ao envelhecimento⁴.

A fisiopatologia da sarcopenia é complexa, pois vários processos contribuem para seu desenvolvimento⁵. As alterações hormonais associadas ao envelhecimento exercem grandes influências nesse processo, dentre as quais a redução dos níveis circulantes de hormônios anabólicos recebem destaque. Os níveis de testosterona começam a diminuir gradualmente nos homens entre 30-40 anos⁶ e mais rapidamente em mulheres entre os 20 e 45 anos⁷. Este esteroide participa de um conjunto de respostas fisiológicas, das quais aumenta a síntese proteica muscular⁸. Um recente estudo realizado com idosos foi capaz de evidenciar os efeitos da testosterona depois de detectar que sua reposição resultou em aumentos da massa e força musculares em indivíduos acima dos 60 anos⁹.

Ainda relacionado aos esteroides sexuais, acredita-se também que a transição da menopausa e subsequente queda dos níveis de estrógenos participem da perda de massa muscular que acompanha o envelhecimento feminino¹⁰. Há dados que demonstram correlação entre concentração sanguínea de estrógenos, estrona e estradiol, com a massa muscular em mulheres com idades entre 64 e 93 anos¹¹. Embora não seja completamente conhecida essa relação entre estrógenos e massa muscular com o avanço da idade, vale destacar que a associação entre redução de estrógenos circulantes e aumento de citocinas pró-inflamatórias parece explicar parte do papel atribuído aos esteroides sexuais femininos no desenvolvimento da sarcopenia¹².

Outra importante alteração endócrina é representada por reduções dos níveis circulantes de hormônio do crescimento (GH). Sua secreção é máxima durante a puberdade, acompanhada de aumento da concentração sérica de fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e seguida de declínio gradual a partir da vida adulta¹³. As ações promotoras

de crescimento do GH sobre o tecido muscular são mediadas pelo IGF-1 tanto sintetizado no fígado, como localmente¹⁴. Depois de classicamente descritos os efeitos do IGF-1 sobre a regulação da massa muscular¹⁵, passaram a ser mais clara as relações entre menores concentrações de IGF-1 com aumento de atrofia muscular, o que inclui o processo de envelhecimento. Entretanto, ainda são controversos os efeitos da reposição de GH associada ao avanço da idade. A ineficiência em melhorar a massa muscular em idosos após tratamento com GH pode ser atribuída a menor expressão de receptores de IGF-1 na membrana celular¹⁶, bem como a resistência insulínica acompanhada de menor transporte de aminoácidos e síntese proteica¹⁷.

Associado às reduções de hormônios anabólicos, observam-se também aumentos de mediadores catabólicos. Os glicocorticoides são conhecidos indutores de atrofia muscular e aumentos da incidência de doenças resultam em hipersecreção de glicocorticoides com o envelhecimento¹⁴. Modelos experimentais com animais em idade avançada evidenciam menor capacidade para regular a massa muscular diante de elevadas concentrações de glicocorticoides. Esses efeitos são evidentes quando ratos idosos exibem recuperação mais lenta da massa muscular em comparação aos pares mais jovens, após condições catabólicas decorrentes do uso de dexametasona¹⁸.

Além dos fatores endócrinos, várias outras influências contribuem para o desenvolvimento da sarcopenia, dentre elas: maiores concentrações de citocinas inflamatórias como fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), perda da capacidade absorviva de nutrientes, déficit de energia na alimentação e inadequado fornecimento de proteínas pela dieta, doenças neurodegenerativas que afetam os motoneurônios, inatividade física e estados de imobilização (como longa permanência no leito hospitalar) e mudanças severas da composição corporal (perda de massa corporal e massa muscular e aumento de adiposidade) devido a várias doenças (condição denominada caquexia)² (Figura 1). A instalação crônica e o somatório desse conjunto de influências resultam em mudanças na proporção e tamanho das fibras que compõem o aparato contrátil do tecido muscular.

O tecido muscular esquelético é constituído por fibras com metabolismo predominantemente oxidativo (de contração lenta; fibras tipo I) e por fibras onde predomina o metabolismo glicolítico (de contração rápida; fibras tipo II)¹⁹. As fibras tipo I apresentam maior sensibilidade e responsividade à insulina²⁰⁻²², são pequenas, produzem baixa tensão, mas são altamente resistentes à fadiga porque possuem maior densidade mitocondrial e são efetivas em metabolizar ácidos graxos para produzir energia²³. Por outro lado, as fibras tipo II são mais sensíveis aos estímulos da contração²⁴, são de maiores calibres, produzem enorme

tensão, mas apresentam pobre resistência à fadiga, existindo também fibras intermediárias que apresentam características intermediárias às anteriormente citadas²⁵.

Figura 1 – Fatores relacionados à sarcopenia

Condições potenciais envolvidas no desenvolvimento da sarcopenia. Pode resultar em associação com doenças inflamatórias, má nutrição, desuso ou desordens endócrinas. Essas condições podem acelerar a perda de massa muscular associada ao processo natural de envelhecimento.

Fonte: Adaptado de: Muscaritoli *et al.*, 2010⁵.

Com o avanço da idade, ocorrem alterações das fibras musculares que têm seu diâmetro reduzido tanto em humanos²⁶ quanto em modelos animais^{27,28}. Ocorrem também mudanças na proporção dos diferentes tipos de fibras²⁹, redução de proteínas contráteis^{30,31} e acúmulo de proteínas oxidadas³². Particularmente na relação com o envelhecimento, tais mudanças sobre a massa muscular representam um problema de saúde devido à perda de mobilidade e força³³, declínio gradual da densidade mineral óssea³⁴, diminuição da taxa metabólica basal³⁵, queda da captação máxima de oxigênio¹⁰, mudanças na composição corporal com aumento da adiposidade³⁶, aparecimento de resistência à ação da insulina³⁷ e aumento na incidência de diabetes tipo 2^{38,39}. Dessa maneira, compreender como os diversos fatores que afetam o *turnover* proteico influenciam no aumento da taxa de degradação muscular, tem importância primária para controlar o desenvolvimento da sarcopenia e a incidência de doenças com o envelhecimento.

A massa muscular é mantida como resultado do constante balanço entre síntese e degradação proteicas⁴⁰. Aumentos da massa muscular esquelética podem ocorrer devido a

aumentos da taxa de síntese proteica ou queda da degradação, enquanto que a diminuição dessa massa tecidual pode ser influenciada pela inversão desses fatores⁴⁰.

Sob condições fisiológicas, insulina⁴¹ e IGF-1⁴² são agentes reguladores de importantes vias intracelulares, em particular a via PI3-K/Akt, que resulta em uma cascata de ativação de alvos necessários para síntese proteica.

A PI3-K (fosfatidilinositol-3 quinase) é uma quinase de lipídeos composta por duas subunidades constitutivamente associadas: uma regulatória de 85 kiloDaltons (kDa) e uma subunidade catalítica de 110 kDa⁴³. A subunidade regulatória age como uma adaptadora que liga a subunidade catalítica a outros elementos na via de sinalização⁴⁴. Após ativação da PI3-K, há estimulação de serina/treonina quinases dependentes de fosfoinosítídeos-3,4,5 trifosfato (PIP3) entre elas, quinases dependentes de fosfoinosítídeos 1 e 2 (PDK 1 e 2). Estas são responsáveis pela estimulação da Akt 1 que desempenha papel central nesta via, pois é responsável pela regulação de sinais que levam a hipertrofia muscular, além de atuar de modo contrário ao sinais atrofícos^{45,46}.

A Akt é uma proteína intracelular com atividade serina/treonina quinase que possui um domínio N-terminal de homologia *pleckstrin* (PH), um domínio catalítico e um domínio C-terminal regulatório⁴⁷. Através de seu domínio PH pode ser promovida sua associação aos PIP3 da membrana citoplasmática. Quando ativada por fosforilação pela PDK-1, a Akt 1 transloca para o citosol e ativa a síntese proteica (Figura 2).

A mTOR é uma importante proteína localizada a jusante a Akt, que pode aumentar a síntese proteica no músculo esquelético modulando, no mínimo, duas vias distintas: a via p70S6K e a via da proteína PHAS-1 (também chamada 4E-BP1) que age como um regulador negativo do fator 4 de iniciação eucariótico eIF-4E^{41,48}. Nesse sentido, a mTOR parece ter uma função importante e central na integração de uma variedade de sinais de crescimento, desde ativação por fatores de crescimento proteicos e insulina que resultam na síntese proteica, até por simples estímulos nutricionais⁴⁶, como é o caso de aminoácidos provenientes da dieta que também são capazes de ativar diretamente a mTOR, causando subsequente ativação da p70S6K^{48,49}.

Uma vez fosforilada pela mTOR, a ativação da p70S6K resulta na tradução de mRNAs contendo traços oligopirimidina terminal 5' (5'TOP), codificando fatores de alongamento e proteínas ribossomais, o que implica em aumentos da capacidade traducional⁵⁰.

O outro alvo da mTOR, a 4E-BP1 sob condição não fosforilada apresenta-se associada ao fator iniciador de tradução denominado eIF4E, reprimindo sua atividade. Uma vez ativada

pela mTOR, há dissociação do complexo 4E-BP1/eIF4E seguida de aumento da disponibilidade do segundo, levando a aumentos da taxa de início da tradução⁵¹.

Figura 2 – Mecanismos de síntese e degradação proteicas no músculo esquelético

Diferentes vias intracelulares envolvidas na síntese e degradação proteicas no tecido muscular.
Fonte: Adaptado de: Gumucio e Mendias, 2012⁴⁰.

Por outro lado, a Akt também é responsável por modular sinais antiatróficos que são gerados quando ela, por exemplo, fosforila fatores de transcrição da família FoxO, importantes para regular expressão gênica de Atrogin 1 e MuRF 1⁴⁰, ubiquitina ligases que compõem o complexo enzimático do proteassoma 26S^{52,53}. São expressas três isoformas de FoxO no músculo (FoxO1, FoxO3 e FoxO4), que quando fosforiladas residem no citosol e necessitam de desfosforilação para entrar no núcleo celular⁵⁴. A fosforilação das proteínas FoxO por parte da Akt as torna incapazes de entrar no núcleo e promover transcrição⁵⁵.

Além disso, vias ativadas por ligantes de membros da superfamília de fator beta transformador de crescimento (TGF- β) também são responsáveis por regular a massa muscular⁴⁰. Através destas vias, cascatas de transdução de sinais podem ser reguladas com a participação de p38 MAPK e fatores de transcrição Smad2/3⁵⁶. Enquanto p38 MAPK pode regular a atividade de vários fatores de transcrição para controle da expressão gênica⁵⁷, Smad2/3 podem translocar ao núcleo celular onde se ligam ao DNA e regulam diretamente a expressão de genes alvo envolvidos na degradação proteica⁵⁶ (Figura 2).

Condições potenciais que aumentam a taxa de degradação proteica são responsáveis por desequilíbrios do *turnover* proteico e aparecimento de quadro atrófico sobre o tecido muscular, dentre as quais figuram mudanças associadas ao processo natural de envelhecimento. Como resultado, há ativação de sistemas proteolíticos responsáveis pela erosão do tecido muscular, onde cada sistema é composto por efetores específicos, dos quais se destacam: sistema de autofagia, sistema proteassomal, sistema de proteases dependentes de cálcio (calpaínas) e sistema de caspases ativadoras de apoptose². No entanto, as duas principais vias de degradação proteica em células eucarióticas são o sistema ubiquitina-proteassomal e a via autofagia-lisossomal². Porém, continua um grande desafio entender como cada sistema contribui e participa do quadro de atrofia muscular, em particular durante o processo de envelhecimento.

A autofagia é constitutivamente ativa em níveis basais no músculo esquelético² e compreende um processo subcelular evolutivamente conservado para destruição em massa de proteínas e organelas inteiras⁵⁸. Já foram identificados mais de 30 genes (Atg) reguladores de autofagia e envolvidos na formação de autofagossomos⁵⁹. Modelos experimentais com deleção do gene Atg7 específica em músculos resultaram em profundo quadro de atrofia e queda da força relacionada à idade⁶⁰, demonstrando o importante papel que a autofagia desempenha no controle da massa muscular.

Sob condições fisiológicas, o sistema ubiquitina-proteassoma é responsável pela degradação de proteínas de vida curta². As proteínas substratos podem ser mono ubiquitinadas ou moléculas adicionais de ubiquitina podem ser adicionadas para produzir uma proteína poliubiquitinada que se torna alvo para degradação pelo proteassoma⁶¹.

A ubiquitinação de proteínas é representada por reações de várias etapas⁶², onde o primeiro passo compreende a ativação da ubiquitina pela enzima ativadora de ubiquitina, denominada E1. Subsequentemente E1 transfere a ubiquitina ativada para o sítio ativo de uma enzima conjugadora de ubiquitina, denominada E2. Por fim, a enzima conjugadora liga-se a uma ligase (E3) que reconhece o substrato e transfere ubiquitina para proteína alvo^{63,64}. A

caracterização molecular de algumas E3 ligases permitiu a descoberta de que MuRF 1 liga-se a proteínas miofibrilares como titina⁶⁵ e miosina de cabeça pesada, a mais abundante proteína no músculo esquelético⁶⁶. Além disso, outra E3 ligase Atrogina 1 foi caracterizada como capaz de exercer sua atividade sobre proteínas como MyoD⁶⁷ e eIF3f⁶⁸.

Além disso, também são incessantes as buscas de novas ou eficazes abordagens terapêuticas capazes de se contrapor aos processos responsáveis pela atrofia muscular como possível efeito antienvelhecimento.

Na busca de tratamentos para conter efeitos naturais do envelhecimento, ainda é alvo de muitas discussões a estratégia de reposição hormonal e sua viabilidade. Nesse contexto, alguns são os candidatos com potencial de sucesso, dos quais mais recentemente surgiram grandes interesses experimentais e clínicos quanto ao uso da desidroepiandrosterona (DHEA)⁶⁹, comercializada com suplemento nutricional nos Estados Unidos e disponível em prateleiras¹⁴, sobre a qual se documentam efeitos antienvelhecimento através de seu possível papel antiinflamatório, quimioprotetor, antidiabetogênico, antiobesogênico, entre outros.

A desidroepiandrosterona (DHEA) é um hormônio esteróide abundantemente produzido pela glândula adrenal em humanos⁷⁰, cujos papéis biológicos são amplamente estudados. O DHEA e a forma sulfatada (DHEA-S) apresentam comportamento oscilatórios dos níveis plasmáticos ao longo da vida, havendo aumento de seus níveis entre os 6 e 7 anos de idade, alcance de seus níveis máximos entre segunda e terceira década de vida que desde então declinam para, aproximadamente 15% do pico ao redor da oitava/nona década^{70,71}. Apesar do DHEA não ser produzido pelas adrenais de ratos, uma gama de estudos já demonstraram que vários tecidos desses animais são capazes de responder ao esteróide quando administrado exogenamente⁷²⁻⁷⁵.

Sabe-se que o DHEA é um precursor de esteroides sexuais e que seus efeitos são, em parte, dependentes de sua conversão a estrógeno e andrógeno⁷⁶. Mais recentemente, apareceram as primeiras evidências de que o músculo esquelético também expressa enzimas esteroidogênicas, juntamente com as gônadas, adrenais, mucosa gástrica, placa de crescimento tibial e o cérebro, tornando o músculo uma importante fonte extragonadal de esteróides sexuais por ser capaz de sintetizar localmente testosterona e estradiol a partir do DHEA de maneira dose-dependente⁷⁷.

Além disso, Aragno e colaboradores⁷⁸ haviam observado em modelos de ratos com diabetes induzido, que o DHEA desempenha papel antioxidante no tecido muscular esquelético através de regulação do desbalanço oxidativo sobre fatores miogênicos daqueles animais após 21 dias de tratamento com o esteróide. Este esteróide tem sido apontado como capaz de

prevenir danos teciduais induzidos por hiperglicemia aguda e crônica⁷⁹, além de eficiente no papel como antioxidante^{80,81}.

No entanto, ainda não está claro se o tratamento com DHEA é capaz de reverter ou minimizar alterações do tecido muscular que acompanham o envelhecimento natural. Fatores como o estresse oxidativo, a inflamação crônica subclínica e o desbalanço proteico estão relacionados com a instalação da sarcopenia durante o processo natural de envelhecimento. Diante do exposto, este estudo se propôs testar a hipótese de que o DHEA seja capaz de minimizar ou retardar a perda de massa muscular associada ao envelhecimento, regulando alguns dos fatores envolvidos no processo de sarcopenia.

2 OBJETIVOS

Caracterizar a presença de sarcopenia em ratos com diferentes idades e investigar se a suplementação com DHEA por três semanas é capaz de modular parte desses efeitos.

Para tanto foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. homeostase glicêmica através da detecção da constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) e da tolerância à glicose (ipGTT);
2. força muscular voluntária máxima e massa muscular relativa dos músculos Sóleo e EDL;
3. o estado de proteólise muscular por meio da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma;
4. a expressão das proteínas intracelulares Akt 1, p70S6K [S6K1], MuRF 1 e Atrogina 1/MAFbx.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 2, 6, 13 e 24 meses de idade fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), com devida aprovação da Comissão de ética em experimentação animal local em relação aos procedimentos utilizados.

3.2 Materiais

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) são da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), DHEA, albumina, colagenase tipo V e poli-lisina são fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (*St. Louis, MO*) e insulina regular pela Lilly. A membrana de nitrocelulose, ECL e os kits para detecção por quimioluminescência são fornecidos pela *Amersham (UK)*.

3.3 Métodos

3.3.1 Administração de DHEA

Ratos Wistar machos com 2, 6, 13 e 24 meses receberam doses com veículo (óleo mineral) contendo ou não DHEA (10 mg/kg) em injeção subcutânea a cada sete dias, totalizando 3 doses. Dessa maneira, foram separados em grupos de animais tratados com veículo (GRUPO VEÍCULO) ou com veículo + DHEA (GRUPO DHEA). Após 21 dias do início do tratamento, os animais foram submetidos a narcose por CO₂ (câmara de gás com 70% CO₂ + 30% O₂) e imediatamente decapitados para subsequente extração dos tecidos e coleta de sangue, conforme representado na figura 1.

Figura 3 – Representação do esquema de tratamento dos animais e sua alteração

No painel A está representado o esquema de tratamento de acordo com a escala de tempo (0 a 21 dias). O painel B exibe a alteração no esquema de tratamento necessária para garantir que, quando separados para estes procedimentos, os mesmos animais fossem submetidos aos testes (ipGTT, força voluntária máxima e ipITT) nos referidos dias antes do sacrifício. * O sacrifício foi realizado no 21º dia de tratamento, com exceção dos animais selecionados para o ipGTT, teste de força e ipITT, sacrificados no 22º dia.

3.3.2 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal curto para determinação da constante de decaimento da glicose (K_{itt})

Para avaliar a sensibilidade à insulina após privação alimentar de 10 a 12 horas (retirada da ração e troca das caixas), os animais foram pesados e acondicionados no ambiente do teste (laboratório) por, no mínimo, 30 minutos antes do início dos procedimentos, adaptados de Murali e Goyal⁸². Com os animais acordados, após medida da glicemia de jejum foi injetada solução de insulina (2 U/ml/kg de massa do animal) no quadrante inferior esquerdo da cavidade peritoneal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas em glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche®) para dosagem da glicemia nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após injeção de insulina. Foi obtida a constante de decaimento da glicose (K_{itt}) através da fórmula $K=0,693/t^{1/2}$, onde $t^{1/2}$ indica tempo de meia vida da glicose

plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear do decaimento da glicose plasmática^{83,84}.

3.3.3 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

Após privação alimentar de 10 a 12 horas (retirada da ração e troca das caixas), os animais foram pesados e acondicionados no ambiente do teste (laboratório) por, no mínimo, 30 minutos antes do início dos procedimentos. Com os animais acordados, após medida da glicemia de jejum foi injetada solução glicose 20% (2g/kg de massa do animal)⁸⁵ no quadrante inferior esquerdo da cavidade peritoneal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas em glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche®) para dosagem da glicemia nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após infusão da solução glicose 20%. A partir das glicemias foi feita medida da área sob a curva da glicose obtida pelo teste para representar o grau de tolerância à glicose entre os diferentes grupos avaliados.

3.3.4 Teste da força voluntária máxima

O protocolo do teste foi obtido e adaptado do estudo de Hornberger e Farrar⁸⁶, que consiste no uso de escada com dimensões de 110 cm de altura por 18 cm de largura, inclinação 80 °C e com espaçamento de 2 cm entre os degraus (Figura 2). No topo da escada há uma câmara de 20 x 20 x 20 cm para abrigo do animal durante o repouso entre as tentativas de escalada. Na base da escada há uma estrutura fixada que garante ao primeiro dos degraus distância suficiente do chão, evitando qualquer contato da calda do animal ou do sistema de sobrecarga com o solo.

Para fixação da sobrecarga foram utilizados: 13,5 cm de cabo de aço inoxidável unidos entre si em formato de círculo; 1 Coastlock Snap Swivel para fixar os cilindros (falcons) com pesos (chumbo) utilizados nas tentativas do teste. O Coastlock Snap Swivel foi fixado na porção proximal da calda do animal por uma Scotch 23 Rubber Tape (Scotch 3M) para posterior incremento dos cilindros conforme a progressão da sobrecarga.

A familiarização do animal ao aparato consistiu de quatro tentativas de escalada por dia, conduzidos por um período de três dias consecutivos. Antes da primeira tentativa, o animal permaneceu durante dois minutos na câmara (topo da escada) com o intuito de perceber que aquele ambiente não o oferece perigo. Entre cada tentativa o animal permaneceu em repouso por 60 segundos na câmara. Na primeira tentativa, o animal foi colocado na parte

proximal da escada junto aos últimos degraus, sendo esta escalada considerada uma tentativa muito fácil. Na segunda, o animal foi posicionado à distância aproximado de 30 cm da câmara, sendo esta escalada considerada uma tentativa fácil. Na terceira, era posicionado na metade da escada (distância aproximada de 55 cm da entrada da câmara), sendo considerada uma tentativa de dificuldade média. Na quarta e última tentativa, foi colocado na parte distal (início) da escada a 110 cm de distância da entrada da câmara, considerada a escalada de maior dificuldade. Quando necessário, toques suaves eram aplicados na cauda do animal para estimulá-lo a subir.

Figura 4 – Aparato para teste de força voluntária máxima

Rato e o cilindro (falcon) com peso fixado a cauda realizando subida da escada de 110 cm com 80° de inclinação. No topo da escada, há uma câmara que serve de abrigo para repouso entre as tentativas.

Dois dias após a familiarização foi realizado o teste para determinação da carga máxima conduzida pelo animal. Foi usado período de 60 segundos como intervalo de descanso entre todas as tentativas (aquecimento e teste). Inicialmente os animais eram estimulados a realizar duas escaladas (metade do percurso e completo) como preparação (aquecimento). Para o teste, na primeira escalada foi aplicada sobrecarga referente a 75% da massa corporal do animal. Para as demais tentativas era feito incremento de 30g até alcançar a sobrecarga na qual não conseguissem mais subir completamente a escada. Em seguida, era realizada uma última tentativa com 15g a menos da tentativa anterior. A falha foi determinada quando o animal não conseguia escalar após três estímulos (toques) sucessivos na calda. A carga máxima foi definida por aquela em que o animal foi capaz de realizar a última escalada completa. A carga máxima foi corrigida como percentual da massa corporal de cada animal e usada para representar a força voluntária máxima.

3.3.4.1 Alterações (ajustes) do protocolo

Ao iniciar a fase de familiarização para os animais de 24 meses, foi observado que apresentavam maiores dificuldades para realizar as escaladas, mesmo sem uso de qualquer sobrecarga. Este acontecimento evidenciou uma importante limitação funcional por parte desta idade. Tal fato também chamou atenção em razão do teste ser realizado com sobrecarga inicial equivalente a 75% de sua massa corporal. Temendo a inadequação do teste e que esse grupo de idade não fosse capaz de realizá-lo, foram realizados ajustes do protocolo para que o mesmo fosse fidedigno às condições dos animais naquelas circunstâncias. Abaixo são apresentados os ajustes realizados tanto no período de familiarização quanto no teste:

Familiarização: foram feitas mudanças no período de intervalo entre cada escalada, aumentando o tempo para 120 segundos (duas vezes o tempo aplicado às outras idades);

Teste: O intervalo de descanso entre todas as tentativas (aquecimento e teste) foi de 120 segundos. Para o teste, na primeira escalada foi aplicada sobrecarga inicial referente a 25% da massa corporal do animal. As demais tentativas foram acompanhadas por incrementos de 15 g até alcançar a sobrecarga na qual não conseguissem mais subir completamente a escada.

3.3.4.2 Dosagem de lactato circulante

Para se certificar de que o grupo com 24 meses de idade estava sendo levado ao mesmo grau de exaustão pelo teste de força voluntária máxima que os controles com 2 meses,

foram feitas dosagens dos níveis circulantes de lactato nesses grupos no período do teste. Amostras de sangue da cauda foram coletadas em lactímetro (Accutrend® Lactate, Roche, Mannheim, Alemanha) para dosagem da lactacidemia nos períodos antes do início do teste e imediatamente após a última tentativa de escalada.

3.3.5 Atividade do proteassoma no sítio da quimiotripsina

A atividade do proteassoma no sítio quimiotripsina da porção 20S foi avaliada nos músculos Sóleo e EDL dos animais estudados por meio de ensaio fluorimétrico, utilizando o peptídeo fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), conforme descrito por Lu e colaboradores⁸⁷. Os músculos foram homogeneizados com polytron (1:10 peso/volume) em tampão de lise (Mannitol 210 mM, sucrose 70 mM, MOPS 5 mM e EDTA 1 mM, pH 7.4) e os extratos foram centrifugados (12000 rpm a 4 °C por 10 minutos) para a remoção do material insolúvel. Os ensaios foram realizados em microplaca de poliestireno preta sólida com 96 poços, com diluição de 25 µg (Sóleo) e 50 µg (EDL) de proteínas citosólicas em 200 µL de MOPS 10 mM (pH 7,4, contendo LVYY-AMC 25 mM [substrato], ATP 25 mM e Mg²⁺ 5 mM), conforme Cunha e colaboradores⁸⁸. O tampão utilizado para o ensaio contém detergentes que atuam como estimuladores da atividade da peptidase, sendo esta atividade determinada pela liberação do grupo AMC (amido-4-methylcoumarin), após degradação detectada por fluorímetro (λ_{exc} 390 nm, λ_{em} 460 nm). A atividade da peptidase foi medida na ausência e na presença (20 µM) de inibidor específico do proteassoma (epoxomicina) e a diferença entre ambas foi atribuída ao proteassoma no ensaio.

3.3.6 Extração de proteínas totais dos músculos esqueléticos e *Immunoblotting*

Para análises da expressão tecidual e fosforilação das proteínas intracelulares os músculos selecionados, Sóleo e Extensor digital longo (EDL), foram homogeneizados com *Polytron*® em 1,5 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad) e foram tratados com tampão de Laemmli⁸⁹, acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V) e 50 a 75 µg de proteínas totais foram

submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%, 8% e 6,5%) no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). Em cada gel há marcadores de pesos moleculares com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *BioRad* a 120 V por 2 horas, como descrito por Towbin e colaboradores⁹⁰, ou a 240mA por 12 horas para melhor transferência das proteínas de elevado peso molecular. Porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 1-2 horas sob leve agitação. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) *overnight* a temperatura de 4 °C sob leve agitação e lavadas com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, estas membranas, sob o mesmo padrão de agitação, foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente e solução para detecção por quimiluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas nas auto-radiografias reveladas foi determinada através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um *scanner* (XEROX WORKCENTRE 3119) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation). As bandas representativas das proteínas foram normalizadas pela densitometria das membranas coradas com vermelho de Ponceau, conforme proposto por Romero-Calvo e colaboradores⁹¹.

3.3.7 Análise estatística

De acordo com o modelo metodológico apresentado pelo presente estudo, todas as análises foram realizadas comparando apenas duas diferentes idades entre si, reproduzindo as condições experimentais as quais foram submetidos todos os grupos avaliados. Devido às limitações para dispor de animais de todas as idades (2, 6, 13 e 24 meses) ao mesmo tempo, adotou-se o critério de que para cada conjunto de experimentos realizados sempre foram pareados animais de 2 meses com as demais idades (2 meses VS 6 meses; ou 2 meses VS 13 meses; ou 2 meses VS 24 meses), além de seus respectivos subgrupos (VEÍCULO e DHEA).

Sendo assim, a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do programa GraphPad Prism® versão 5.01. O tamanho amostral mínimo por grupo para cada parâmetro analisado foi definido respeitando os seguintes critérios: a) N resultante de pelo menos três experimentos distintos; b) N suficiente para realização da análise da distribuição

das amostras através do “D’Agostino and Pearson omnibus K2 normality test” recomendado pelo programa GraphPad Prism® na versão descrita acima. Para os resultados finais quando as amostras não apresentam normalidade da distribuição, adota-se uma das seguintes transformações diretas dos dados: a logarítmica, a logarítmica dos (dados + 1), a raiz quadrada dos dados, ou a raiz quadrada dos (dados + 1). Após atender ao critério de normalidade para aplicação da análise paramétrica, o tratamento estatístico é seguido por análise de variância de dois fatores (2way ANOVA). Quando o teste apresenta diferença significativa a análise é seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni (Bonferroni Post-Tests) com nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Os resultados apresentados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($M \pm EPM$) e posteriormente representados como percentagens de variação em relação ao grupo 2 meses veículo, aos quais se atribui valor de 100% às condições em que isto se aplica.

4 RESULTADOS

4.1 Características zoométricas

As características gerais dos animais são apresentadas na tabela 1, onde a massa corporal dos animais é representada em gramas, a massa tecidual relativa é representada em miligramas (músculos) ou em gramas (tecidos adiposos) para cada 100 g de massa corporal do próprio animal.

A massa corporal apresentou diferenças de acordo com o aumento da idade, sendo maior em todas as idades comparadas ao grupo de menor idade. Na comparação com o grupo 2 meses veículo (100%) de cada conjunto de experimentos, a média da massa corporal nas demais idades (veículo) foi de $151 \pm 3\%$ aos **6 meses**, $178 \pm 6\%$ aos **13 meses** e $157 \pm 10\%$ aos **24 meses**. Não foram observados efeitos do DHEA sobre este parâmetro avaliado.

O envelhecimento afetou a massa muscular, de modo que a sarcopenia pode ser parcialmente representada pela significativa redução da massa relativa dos músculos Sóleo e EDL a partir dos 13 meses de idade, sendo mantida menor proporção na idade mais avançada (24 meses). Na comparação com cada grupo 2 meses veículo (100%), a massa relativa do Sóleo foi de $99 \pm 3\%$ (**6 meses veículo**), $87 \pm 3\%$ (**13 meses veículo**) e $87 \pm 5\%$ (**24 meses veículo**). Para o músculo EDL, a massa relativa entre cada idade foi de 100% (**2 meses veículo**), $98 \pm 2\%$ (**6 meses veículo**), $91 \pm 3\%$ (**13 meses veículo**) e $87 \pm 3\%$ (**24 meses veículo**). A massa relativa dos músculos Sóleo e EDL não foi alterada pelo tratamento com DHEA.

A adiposidade também apresentou mudanças associadas ao envelhecimento, sendo significativamente maior aos 13 meses e se mantendo aumentada na idade mais avançada (24 meses). Quanto a gordura periepididimal, a massa relativa entre cada idade foi de 100% (**2 meses veículo**), $109 \pm 8\%$ (**6 meses veículo**), $164 \pm 25\%$ (**13 meses veículo**) e $196 \pm 29\%$ (**24 meses veículo**), enquanto a gordura retroperitoneal foi de 100% (**2 meses veículo**), $106 \pm 7\%$ (**6 meses veículo**), $191 \pm 29\%$ (**13 meses veículo**) e $209 \pm 37\%$ (**24 meses veículo**). Não foi observado qualquer efeito do DHEA sobre a adiposidade.

Tabela 1 - Massa corporal e massas relativas de tecidos musculares e adiposos dos animais tratados com óleo mineral (veíc.) ou hormônio dissolvido em óleo mineral (DHEA) em diferentes idades

	2m Veíc.	2m DHEA	6m Veíc.	6m DHEA		2m Veíc.	2m DHEA	13m Veíc.	13m DHEA		2m Veíc.	2m DHEA	24m Veíc.	24m DHEA
M. corporal	304 ± 7	307 ± 7	459 ± 10*	447 ± 11†		310 ± 6	324 ± 11	552 ± 19*	533 ± 23†		291 ± 8	308 ± 7	455 ± 29*	500 ± 15†
M. Rel. Sóleo	38,54 ± 0,9	39,32 ± 0,9	38,22 ± 1,1	40,18 ± 1,2		40,07 ± 1,2	39,82 ± 0,8	34,99 ± 1,4*	34,86 ± 1,3†		40,76 ± 1,3	40,49 ± 0,7	35,3 ± 1,9*	33,47 ± 1,4†
M. Rel. EDL	43,69 ± 0,6	43,53 ± 0,7	42,75 ± 0,7	43,11 ± 0,8		43,53 ± 0,5	44,64 ± 0,7	39,56 ± 1,2*	39,63 ± 1,2†		47,15 ± 0,8	46,75 ± 1,1	40,92 ± 1,3*	39,54 ± 1,1†
M. Rel. Gord. Periepididimal	0,84 ± 0,05	0,89 ± 0,08	0,91 ± 0,06	0,98 ± 0,05		0,79 ± 0,06	0,80 ± 0,03	1,29 ± 0,20*	1,42 ± 0,23†		0,83 ± 0,07	0,77 ± 0,06	1,62 ± 0,24*	1,75 ± 0,16†
M. Rel. Gord. Retroperitoneal	0,89 ± 0,10	0,83 ± 0,10	0,94 ± 0,06	1,03 ± 0,07		0,71 ± 0,08	0,76 ± 0,07	1,36 ± 0,20*	1,31 ± 0,21†		0,71 ± 0,05	0,76 ± 0,08	1,36 ± 0,26*	1,31 ± 0,13†

Os valores na tabela estão expressos como Média±Erro Padrão da Média. **M. Corporal** (massa corporal) representada em gramas; **M. Rel. Sóleo** (Massa relativa do músculo Sóleo) e **M. Rel. EDL** (Massa relativa do músculo EDL) representadas em miligramas de músculo/100 gramas de massa corporal do animal; **M. Rel. Gord. Periepididimal** (Massa relativa da gordura Periepididimal) e **M. Rel. Gord. Retroperitoneal** (Massa relativa da gordura Retroperitoneal) representadas em gramas de gordura/100 gramas de massa corporal do animal. **Amostra:** 2m veíc. (22 animais), 2m DHEA (26), 6m veíc. (27), 6m DHEA (27); 2m veíc (16), 2m DHEA (16), 13m veíc (15), 13m DHEA (18); 2m veíc. (16), 2m DHEA (16), 24m veíc. (13) e 24m DHEA (13). * representa diferença significativa na comparação com o grupo 2 meses veículo; † representa diferença significativa na comparação com o grupo 2 meses DHEA. Diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$.

4.2 Homeostase glicêmica

A figura 5 mostra que as glicemias em jejum foram semelhantes entre as idades (**2 meses veículo:** 100%, **6 meses veículo:** $99 \pm 1\%$ e **13 meses veículo:** $98 \pm 2\%$, fig. 5A) e que a partir dos 6 meses é possível detectar menor sensibilidade à insulina associada ao aumento da idade (**2 meses veículo:** 100%, **6 meses veículo:** $84 \pm 5\%$ e **13 meses veículo:** $85 \pm 7\%$, fig. 5B).

Figura 5 – Glicemias de jejum e sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (K_{itt}) em ratos com 2, 6 e 13 meses

No painel A, a glicemia medida após jejum noturno (12hs), **amostra:** 2m veíc. (11 animais), 2m DHEA (14), 6m veíc. (17), 6m DHEA (16); 2m veíc. (9), 2m DHEA (10), 13m veíc. (8), 13m DHEA (9); no painel B, e a sensibilidade à insulina foi medida através da constante de decaimento da glicose (K_{itt}), **Amostra:** 2m veíc. (12 animais), 2m DHEA (12), 6m veíc. (13), 6m DHEA (12); 2m veíc. (10), 2m DHEA (8), 13m veíc. (8), 13m DHEA (13). Esta medida representa o percentual de decaimento da glicemia por minuto. * representa diferença significativa em comparação ao grupo 2 meses, onde $p < 0,05$.

O tratamento com DHEA não influenciou na sensibilidade à insulina nas três faixas de idade apresentadas na figura anterior (Fig. 5).

No grupo de ratos com 24 meses de idade não foram observadas diferenças nas glicemias de jejum (Figura 6A) e na constante de decaimento da glicose (**2 meses:** 100% e **24 meses:** $108 \pm 9\%$) (Figura 6B).

Figura 6 – Glicemias de jejum e teste e sensibilidade à insulina pela constante de decaimento da glicose (K_{it}) em ratos com 2 e 24 meses

Ao atingir a idade os animais com 24 meses foram pareados com um grupo de 2 meses. Foram medidas as glicemias após jejum (12hs)(painel A) e em seguida submetidos ao ipITT (painel B) **Amostra:** 2 meses (8 animais) e 24 meses (8). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

Através da medida da área total sob a curva da glicose dos testes de tolerância à glicose foram observadas semelhanças tanto com o aumento da idade quanto com o tratamento com DHEA, entre os grupos com **2, 6 e 13 meses de idade** (100%, $106 \pm 6\%$ e $98 \pm 8\%$, respectivamente) (Figura 7).

No grupo com 24 meses de vida também foi detectada semelhança com ratos de 2 meses. (**2 meses:** 100% versus **24 meses:** $100 \pm 5\%$).

Figura 7 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) em ratos com 2, 6 e 13 meses

O painel A exibe gráficos das curvas de glicemia dos animais após infusão intraperitoneal de glicose. O painel B exibe o gráfico representativo das áreas sob a curva da glicose após o ipGTT. **Amostra:** 2m veic. (5 animais), 2m DHEA (10), 6m veic. (9), 6m DHEA (9); 2m veic. (8), 2m DHEA (6), 13m veic. (6), 13m DHEA (8). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

Figura 8 – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) em ratos com 2 e 24 meses

Na figura são apresentados os gráficos da curva glicêmica frente ao ipGTT (painel A) e a área total sob a curva da glicemia gerada após o teste (painel B). **Amostra:** 2 meses (7 animais) e 24 meses (7). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4.3 Análise da força voluntária máxima

De acordo com o protocolo de carga máxima, a força voluntária máxima é definida pela última carga (máxima) em que o animal foi capaz de realizar a escalada completa no aparato usado (escada). Após encontrar a carga máxima no teste, o valor foi expresso como percentual de sua massa corporal. Os resultados obtidos mostram que a partir dos 6 meses já é possível encontrar diferenças significativas na força voluntária máxima de ratos Wistar.

Como mostra a figura 9, o grupo **6 meses veículo** foi capaz de realizar a escalada com uma sobrecarga relativa média de $97 \pm 4\%$ de sua massa corporal, enquanto o grupo **2 meses veículo** foi capaz de executar a mesma tarefa com uma sobrecarga média equivalente a $117 \pm 9\%$ de sua massa corporal. Na comparação entre 2 e 13 meses também foi possível identificar diferenças. Enquanto o grupo com **2 meses veículo** foi capaz de alcançar sobrecargas médias de $117 \pm 7\%$ para completar aquela tarefa, o grupo com **13 meses veículo** alcançou sobrecarga média de $89 \pm 5\%$. Entre as idades citadas acima, não houve efeito do DHEA sobre a força voluntária máxima.

Figura 9 – Representação da força voluntária máxima de ratos com 2, 6 e 13 meses

Quando comparado aos animais com 2 meses, observa-se que ratos com 6 ou 13 meses apresentam menor capacidade de produzir a força necessária para mobilizar uma sobrecarga relativa. **Amostra:** 2m veíc. (5 animais), 2m DHEA (6), 6m veíc. (6), 6m DHEA (6); 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (7), 13m veíc. (5), 13m DHEA (7). Os valores são expressos com Média±Erro Padrão da Média. * representa diferença significativa em relação aos grupos com 2 meses, onde o $p < 0,05$.

Como mostra a figura 10, o grupo mais velho apresentou expressiva perda da força, sendo a força voluntária máxima dos animais **2 meses** representada pela capacidade de realizar o teste com uma sobrecarga de $101 \pm 5\%$ de sua massa corporal, enquanto o grupo **24 meses** foi capaz de realizar o teste apenas com a sobrecarga de $36 \pm 3\%$ de sua massa corporal.

Figura 10 – Representação da força voluntária máxima de ratos com 2 e 24 meses

Quando comparado aos animais com 2 meses, observa-se que ratos 24 meses apresentam menor capacidade de produzir a força necessária para mobilizar uma sobrecarga relativa. **Amostra:** 2 meses (7 animais) e 24 meses (6). Os valores são expressos com Média $\pm$ Erro Padrão da Média. * representa diferença significativa em relação ao grupo 2 meses, onde o $p < 0,05$.

Em função da visível limitação funcional de alguns ratos do grupo de maior idade, houve a necessidade de adaptar o protocolo do teste de força, cujas modificações para este grupo estão descritas na sessão de métodos. Além de observar que a quantidade de tentativas realizadas foi semelhante entre os dois grupos de idade, a determinação da concentração sanguínea de lactato antes e imediatamente após o teste de força (entre 2 e 24 meses) confirmou que os ajustes no protocolo para o grupo de maior idade foram suficientes para levar este grupo ao mesmo grau de exaustão do grupo 2 meses (Figura 11). A lactacidemia (mmol/L) imediatamente após o teste apresentou aumento em ambas as idades (**2 meses:** $3,4 \pm 0,1$ antes e $6,1 \pm 0,1$ depois versus **24 meses:** $3,1 \pm 0,1$ antes e $5,5 \pm 0,4$ depois, Figura 11A) com percentual de variação semelhante (**2 meses:** $59 \pm 4\%$ versus **24 meses:** $58 \pm 4\%$) (Figura 11B).

Figura 11 – Concentrações séricas de lactato frente ao teste de força voluntária máxima

(A) mostra concentrações de lactato antes (●) e imediatamente após (■) a última tentativa de escalada com carga máxima. (B) apresenta a variação resultante da lactacidemia em resposta ao teste de força. **Amostra:** 2 meses (8 animais), 24 meses (7). * representa diferença significativa dos níveis de lactato (mmol/L) em comparação aos valores pré-teste, onde $p < 0,05$.

4.4 Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma

A atividade deste sistema foi avaliada pela cinética da curva que representa a taxa de degradação protéica sob as condições do ensaio descrito na seção Materiais e Métodos e estão representados nas Figuras 12 e 13.

4.4.1 Músculo EDL

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos no músculo EDL. Nesse músculo, associado a idade observa-se menor atividade do sistema ubiquitina-proteassoma aos 6 e 13 meses, na comparação com os grupos 2 meses de cada conjunto de experimentos (**2 meses veículo:** 100%, **6 meses veículo:** $81 \pm 4\%$ e **13 meses veículo:** $89 \pm 3\%$) (painéis à esquerda e central, respectivamente). Por outro lado, a atividade do sistema no grupo **24 meses veículo** foi equivalente àquela do grupo **2 meses veículo** (100% e $104 \pm 20\%$, respectivamente) (Figura 12, painel à direita).

Não foi observado efeito do tratamento com DHEA sobre a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma.

Figura 12 – Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo EDL

Representação da atividade do sistema avaliada no músculo EDL. **Amostra:** 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (8), 6m veíc. (8), 6m DHEA (8); 2m veíc. (8), 2m DHEA (7), 13m veíc. (6), 13m DHEA (8); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 24m veíc. (6), 24m DHEA (4). * representa diferença significativa na comparação com os grupos de animais com 2 meses em cada conjunto de experimentos, onde $p < 0,05$.

4.4.2 Músculo Sóleo

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos sobre a atividade ubiquitina-proteassoma no músculo Sóleo. Foi observada semelhança da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma entre os grupos de **2, 6 e 13 meses veículo** (100%, $95 \pm 11\%$ e $92 \pm 6\%$, respectivamente) (painéis à esquerda e central). Porém, aos 24 meses essa atividade apresentou-se maior que a observada no grupo com 2 meses de idade (**2 meses veículo:** 100% versus **24 meses veículo:** $127 \pm 7\%$) (Figura 13, painel à direita).

De modo semelhante ao detectado no músculo EDL, o tratamento com DHEA não modificou a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo Sóleo.

Figura 13 – Atividade do sistema ubiquitina-proteassoma no músculo Sóleo

Representação da atividade do sistema avaliada no músculo Sóleo. Amostra: 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (8), 6m veíc. (8), 6m DHEA (8); 2m veíc. (8), 2m DHEA (7), 13m veíc. (6), 13m DHEA (8); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 24m veíc. (6), 24m DHEA (4). * representa diferença significativa na comparação com os grupos de animais com 2 meses em cada conjunto de experimentos, onde $p < 0,05$.

4.5 Immunoblotting das proteínas MuRF 1, Atrogina 1, Akt 1 e p70S6K

A análise de vias relacionadas ao *turnover* proteico em ambos os músculos esqueléticos foi representada pelas expressões protéicas de MuRF 1, Atrogina 1, Akt 1 e p70S6K. Nas figuras a seguir estão representadas em gráfico de barras as variações percentuais a partir do grupo 2 meses veículo, tomado como 100%, na parte inferior dos painéis, e uma representação do *immunoblotting* típico de cada proteína, na parte superior dos painéis.

4.5.1 Músculo EDL

4.5.1.1 Expressão tecidual de MuRF 1

A figura 14 apresenta a representação gráfica das médias da expressão total de MuRF 1 e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias. Na comparação entre grupos de 2 e 6 meses não foram observadas diferenças na expressão desta

proteína porém, o tratamento com DHEA foi responsável por reduzir a expressão total de MuRF 1 nos animais com 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 5\%$, **2 meses DHEA:** $109 \pm 9\%$, **6 meses veículo:** $110 \pm 10\%$ e **6 meses DHEA:** $80 \pm 5\%$) (Figura 14, painel à esquerda).

A comparação entre grupos 2 e 13 meses (Figura 14, painel central) foram observadas semelhanças relacionadas tanto entre as diferentes idades quanto ou tratamento com DHEA, isolados. Porém, entre estas idades foi detectado efeito de interação quando associado ao DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 7\%$, **2 meses DHEA:** $126 \pm 6\%$, **13 meses veículo:** $125 \pm 10\%$ e **13 meses DHEA:** $98 \pm 13\%$).

Quando feitas as comparações entre 2 e 24 meses (Figura 14, painel à direita), observou-se aumento da expressão total de MuRF 1 nos animais mais velhos em comparação ao grupo de menor idade porém, sem efeitos do tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 9\%$, **2 meses DHEA:** $120 \pm 10\%$, **24 meses veículo:** $205 \pm 40\%$ e **24 meses DHEA:** $172 \pm 5\%$).

Figura 14 – Expressão total de MuRF 1 no músculo EDL

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses na comparação com o grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (6 animais), 2m DHEA (6), 6m veíc. (6), 6m DHEA (6); 2m veíc. (3), 2m DHEA (3), 13m veíc. (5), 13m DHEA (4); 2m veíc. (4), 2m DHEA (4), 24m veíc. (2), 24m DHEA (3). ^b representa diferença em comparação ao grupo 6 meses veículo; * representa diferença em comparação ao grupo 2 meses; # representa efeito de interação, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.1.2 Expressão total de Atrogina 1

A figura 15 exibe representação gráfica das médias da expressão total de Atrogina 1 e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias. Na comparação entre grupos de 2 e 6 meses, observa-se que a expressão desta proteína foi reduzida com o aumento da idade e o tratamento do DHEA foi responsável por reduzir ainda mais sua expressão aos 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 4\%$, **2 meses DHEA:** $85 \pm 5\%$, **6 meses veículo:** $67 \pm 4\%$ e **6 meses DHEA:** $48 \pm 5\%$) (Figura 15, painel à esquerda).

Ao comparar grupos de 2 e 13 meses (Figura 15, painel central) não foram observadas diferenças relacionadas tanto ao envelhecimento quanto ao tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 4\%$, **2 meses DHEA:** $133 \pm 10\%$, **13 meses veículo:** $123 \pm 27\%$ e **13 meses DHEA:** $101 \pm 26\%$).

Ao comparar grupos de 2 e 24 meses (Figura 15, painel à direita) também não foram observadas diferenças relacionadas tanto ao envelhecimento quanto ao tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 6\%$, **2 meses DHEA:** $101 \pm 6\%$, **24 meses veículo:** $84 \pm 7\%$ e **24 meses DHEA:** $79 \pm 10\%$).

Figura 15 – Expressão total de Atrogina 1 no músculo EDL

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses em comparação ao grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (6 animais), 2m DHEA (6), 6m veíc. (6), 6m DHEA (6); 2m veíc. (6), 2m DHEA (5), 13m veíc. (7), 13m DHEA (5); 2m veíc. (5), 2m DHEA (5), 24m veíc. (5), 24m DHEA (5). ^a representa diferença em comparação ao grupo 2 meses veículo; ^b representa diferença em comparação ao grupo 6 meses veículo, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.1.3 Expressão total de Akt 1

A figura 16 exibe gráficos da expressão tecidual de Akt 1 e *immunoblotting* típico representativo dessas médias. Na comparação entre 2 e 6 meses, não foram observadas quaisquer alterações na expressão total da proteína quanto a idade ou relacionadas ao tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 6\%$, **2 meses DHEA:** $101 \pm 6\%$, **6 meses veículo:** $87 \pm 6\%$ e **6 meses DHEA:** $85 \pm 11\%$) (Figura 16, painel à esquerda).

Ao comparar grupos de 2 e 13 meses (Figura 16, painel central), foi detectada menor expressão da Akt 1 associada ao envelhecimento. Não foi observado qualquer efeito do tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 7\%$, **2 meses DHEA:** $88 \pm 6\%$, **13 meses veículo:** $75 \pm 19\%$ e **13 meses DHEA:** $56 \pm 8\%$).

Ao comparar grupos de 2 e 24 meses (Figura 16, painel à direita), também foi detectada menor expressão da Akt 1 associada ao envelhecimento. Não foi observado qualquer efeito do tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 9\%$, **2 meses DHEA:** $57 \pm 14\%$, **24 meses veículo:** $36 \pm 5\%$ e **13 meses DHEA:** $30 \pm 3\%$).

Figura 16 – Expressão total de Akt 1 no músculo EDL

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses em comparação ao grupo 2 meses. Aos 13 e 24 meses houve menor expressão total desta proteína. **Amostra:** 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (7), 6m veíc. (6), 6m DHEA (9); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 13m veíc. (6), 13m DHEA (6); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 24m veíc. (5), 24m DHEA (5). * representa diferença na comparação com o grupo 2 meses, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.1.4 Expressão total de p70S6K

A figura 17 exibe gráficos da expressão tecidual de p70S6K e *immunoblotting* típico representativo dessas médias. Não foram observadas diferenças relacionadas ao aumento da idade ou ao tratamento com DHEA entre 2 e 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 3\%$, **2 meses DHEA:** $91 \pm 7\%$, **6 meses veículo:** $109 \pm 17\%$ e **6 meses DHEA:** $119 \pm 22\%$) (Fig.17, painel à esquerda), nem entre 2 e 13 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 11\%$, **2 meses DHEA:** $107 \pm 17\%$, **13 meses veículo:** $103 \pm 15\%$ e **13 meses DHEA:** $90 \pm 7\%$) (Fig. 17, painel central).

Porém, nos animais com 24 meses foi detectada menor expressão total, sem alterações induzidas pelo tratamento com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 11\%$, **2 meses DHEA:** $104 \pm 13\%$, **24 meses veículo:** $81 \pm 10\%$ e **24 meses DHEA:** $55 \pm 23\%$) (Fig. 17, painel à direita).

Figura 17 – Expressão total de p70S6K no músculo EDL

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses em comparação ao grupo 2 meses. Apenas aos 24 meses foram observadas reduções na expressão total da proteína. **Amostra:** 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (8), 6m veíc. (7), 6m DHEA (9); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 13m veíc. (6), 13m DHEA (6); 2m veíc. (4), 2m DHEA (3), 24m veíc. (3), 24m DHEA (2). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.2 Músculo Sóleo

4.5.2.1 Expressão total de MuRF 1

A figura 18 mostra a representação gráfica das médias da expressão total de MuRF 1 e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias. De acordo com os dados apresentados abaixo, não foram observadas diferenças relacionadas ao aumento da idade ou ao tratamento com DHEA entre 2 e 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 9\%$, **2 meses DHEA:** $124 \pm 18\%$, **6 meses veículo:** $144 \pm 38\%$ e **6 meses DHEA:** $120 \pm 10\%$) (Fig. 18, painel à esquerda), nem entre 2 e 24 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 2\%$, **2 meses DHEA:** $109 \pm 6\%$, **24 meses veículo:** $121 \pm 13\%$ e **24 meses DHEA:** $111 \pm 10\%$) (Fig. 18, painel à direita).

Figura 18 – Expressão total de MuRF 1 no músculo Sóleo

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses na comparação com o grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (6 animais), 2m DHEA (5), 6m veíc. (6), 6m DHEA (6); 2m veíc. (4), 2m DHEA (4), 13m veíc. (5), 13m DHEA (4); 2m veíc. (6), 2m DHEA (5), 24m veíc. (6), 24m DHEA (6). * representa diferença em comparação ao grupo 2 meses, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

Porém, ao avaliar sua expressão entre 2 e 13 meses, observou-se maior expressão total da proteína relacionada à idade, sem alterações causadas pelo tratamento

com DHEA (**2 meses veículo:** $100 \pm 6\%$, **2 meses DHEA:** $89 \pm 4\%$, **24 meses veículo:** $150 \pm 8\%$ e **24 meses DHEA:** $152 \pm 12\%$) (Fig. 18, painel central).

4.5.2.2 Expressão total de Atrogina 1

A figura 19 exibe a representação gráfica das médias da expressão total de Atrogina 1 e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias. Tais resultados mostram que não houve mudança na expressão total da proteína com o aumento da idade, entre 2 e 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 4\%$, **2 meses DHEA:** $114 \pm 6\%$, **6 meses veículo:** $94 \pm 6\%$ e **6 meses DHEA:** $78 \pm 7\%$) (Fig. 19, painel à esquerda); 2 e 13 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 4\%$, **2 meses DHEA:** $90 \pm 7\%$, **13 meses veículo:** $79 \pm 5\%$ e **13 meses DHEA:** $64 \pm 3\%$) (Fig. 19, painel central), e entre 2 e 24 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 5\%$, **2 meses DHEA:** $114 \pm 7\%$, **24 meses veículo:** $134 \pm 15\%$ e **24 meses DHEA:** $90 \pm 12\%$) (Fig. 19, painel à direita), e que não foram observados efeitos do tratamento do DHEA, com exceção ao efeito de interação do hormônio nos animais com 6 meses.

Figura 19 – Expressão total de Atrogina 1 no músculo Sóleo

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses na comparação com o grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (7), 6m veíc. (8), 6m DHEA (8); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 13m veíc. (8), 13m DHEA (6); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 24m veíc. (5), 24m DHEA (5). # representa efeito de interação, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.2.3 Expressão total de Akt 1

A figura 20 mostra a representação gráfica das médias da expressão total de Akt 1 e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias. Houve redução de sua expressão associada ao envelhecimento, mas sem efeitos do tratamento com DHEA quando comparados os grupos 2 e 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 3\%$, **2 meses DHEA:** $99 \pm 8\%$, **6 meses veículo:** $74 \pm 8\%$ e **6 meses DHEA:** $51 \pm 10\%$) (Fig. 20, painel à esquerda), grupos 2 e 13 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 8\%$, **2 meses DHEA:** $97 \pm 11\%$, **13 meses veículo:** $71 \pm 4\%$ e **13 meses DHEA:** $67 \pm 6\%$) (Fig. 20, painel central) e grupos 2 e 24 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 5\%$, **2 meses DHEA:** $90 \pm 7\%$, **24 meses veículo:** $68 \pm 10\%$ e **24 meses DHEA:** $81 \pm 19\%$) (Fig. 20, painel à esquerda).

Figura 20 – Expressão total de Akt 1 no músculo Sóleo

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses na comparação com o grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (8 animais), 2m DHEA (7), 6m veíc. (8), 6m DHEA (8); 2m veíc. (4), 2m DHEA (4), 13m veíc. (5), 13m DHEA (4); 2m veíc. (8), 2m DHEA (8), 24m veíc. (6), 24m DHEA (7). * representa diferença em comparação ao grupo 2 meses, onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

4.5.2.4 Expressão total de p70S6K

A figura 21 exibe representação gráfica das médias da expressão total de p70S6K e os *immunoblotting* típicos representativos dessas médias, onde não foram observados quaisquer efeitos relacionados ao aumento da idade ou do tratamento com DHEA nas comparações entre 2 e 6 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 3\%$, **2 meses DHEA:** $102 \pm 8\%$, **6 meses veículo:** 115 ± 22 e **6 meses DHEA:** $109 \pm 10\%$) (Fig. 21, painel à esquerda), 2 e 13 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 3\%$, **2 meses DHEA:** $101 \pm 9\%$, **13 meses veículo:** $90 \pm 10\%$ e **13 meses DHEA:** $85 \pm 9\%$) (Fig. 21, painel central) e 2 e 24 meses (**2 meses veículo:** $100 \pm 7\%$, **2 meses DHEA:** $104 \pm 17\%$, **24 meses veículo:** $105 \pm 16\%$ e **24 meses DHEA:** $94 \pm 14\%$) (Fig. 21, painel à direita).

Figura 21 – Expressão total de p70S6K no músculo Sóleo

Os resultados são expressos como percentuais dos grupos 6, 13 e 24 meses na comparação com o grupo 2 meses. **Amostra:** 2m veíc. (6 animais), 2m DHEA (5), 6m veíc. (6), 6m DHEA (6); 2m veíc. (6), 2m DHEA (6), 13m veíc. (8), 13m DHEA (6); 2m veíc. (4), 2m DHEA (4), 24m veíc. (3), 24m DHEA (3), onde significância foi considerada para $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o propósito de caracterizar alguns dos efeitos naturais do envelhecimento associados à sarcopenia em ratos Wistar e investigar se o tratamento com DHEA é capaz de modular parte desses efeitos. Nos animais tratados com veículo (óleo mineral) ou DHEA nas idades de 2, 6, 13 e 24 meses foram avaliados as características zoométricas. Também foram feitas medidas da força voluntária máxima e homeostase glicêmica através de dois diferentes testes. Nos músculos Sóleo e EDL foram feitas análises da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma e expressão total das proteínas MuRF 1, atrogina 1, Akt 1 e p70S6K.

Desde que foi proposto o termo sarcopenia, muitos são os estudos realizados em modelos animais para representá-la¹⁴. Porém, é robusto o conjunto de evidências que a caracteriza pelas mudanças estruturais e bioquímicas, ou funcionais *in situ* apresentadas pelos mais diversos músculos estudados. Este trabalho apresenta originalmente um dos aspectos da sarcopenia representada pela redução da força muscular voluntária. Considerando que os animais não recebiam estímulos de dor e não foram forçados a realizar a escalada, este teste é proposto como um modelo fisiológico para avaliar a força voluntária máxima, capaz de refletir de maneira mais natural este aspecto funcional em roedores.

Considerando a definição proposta para sarcopenia (perda da massa e força musculares associadas ao aumento da idade)⁹², as reduções da força voluntária máxima e massa muscular relativa (Sóleo e EDL) apresentadas neste estudo nos permite caracterizar pela primeira vez sarcopenia em ratos Wistar a partir de 13 meses de idade. Na literatura, modelos experimentais com animais para estudo da sarcopenia geralmente são representados por roedores com idades acima de 18-20 meses de vida, de diversas linhagens^{93,94}. É de se considerar que o tempo de espera necessário para alcançar determinadas idades aparece como uma das maiores barreiras para o estudo de fenômenos relacionados ao envelhecimento natural. Dessa maneira, apresentamos a linhagem de ratos Wistar a partir de 13 meses como um modelo potencial para estudos da sarcopenia.

Paralelo aos efeitos sobre o sistema muscular, ratos com 13 e 24 meses também apresentaram significativos aumentos da adiposidade, coincidindo com as idades em que foi possível caracterizar a sarcopenia. Em conjunto com os aumentos da

adiposidade, há evidências de que ocorrem elevações das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios com o aumento da idade, que respondem pelo surgimento do quadro inflamatório subclínico crônico durante o envelhecimento⁹⁵. Diversos estudos apontam que sinais pró-inflamatórios estão associados a perda de massa e força musculares¹⁴, sugerindo que tais sinais são capazes de aumentar a atividade de sistemas proteolíticos musculares⁹⁶. Possivelmente, o aumento da adiposidade pode representar um elo entre a inflamação subclínica associada à idade e o surgimento da sarcopenia. No entanto, em nosso estudo os marcadores inflamatórios circulantes ou locais não foram avaliados.

Outra importante relação estabelecida entre adiposidade, marcadores inflamatórios e envelhecimento está associada ao aparecimento de distúrbios na homeostase glicêmica. Tais fatores aparecem como marcadores de risco de algumas enfermidades, entre elas obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2⁹⁷. No estudo de Campbell e colaboradores⁷³, a aplicação de uma única dose de DHEA foi suficiente para, em uma semana, aumentar a sensibilidade à insulina em ratos Wistar com 6 meses. Em nosso estudo, os animais com 6 meses não apresentaram mudanças na sensibilidade à insulina em resposta ao DHEA, mesmo que por um tempo maior de tratamento (3 semanas). Porém, destaca-se que os animais do estudo de Campbell apresentavam massa corporal aproximadamente 30% menor (média de 365 gramas) em comparação aos animais do presente estudo. A massa corporal não foi significativamente diferente entre os dois grupos de 6 meses, porém foi cerca de 50% maior que os grupos com 2 meses de idade. Embora a proporção dos depósitos adiposos avaliados entre os animais com 2 e 6 meses de vida tenha sido equivalente, a maior massa corporal do grupo com mais idade pode justificar a menor sensibilidade à insulina apresentada.

Também foi detectada menor sensibilidade à insulina aos 13 meses e o tratamento com DHEA não influenciou nos resultados. Nesses animais foram detectados maiores massas corporais e adiposidade e menor massa muscular relativa em comparação aos grupos 2 meses. Em conjunto, tais mudanças da composição corporal podem ser responsáveis pela queda apresentada na remoção da glicose sanguínea após estímulo agudo com insulina parenteral. No estudo de Medina e colaboradores⁷⁵ usando ratos Wistar com 12 meses, após uma semana de tratamento com DHEA, detectou-se efeito antidiabetogênico associado à idade ao aumentar a massa de célula β -pancreática e a resposta de secreção da insulina estimulada por glicose. Porém, mesmo com idades

semelhantes, a maior massa corporal média apresentada pelos animais do presente estudo poderia explicar a ausência de efeitos do DHEA, como evidenciado pela melhora da sensibilidade à insulina em outros estudos^{98,99}. Além disso, a maior massa corporal dessa idade parece explicar a diferença de sensibilidade à insulina observada em comparação aos animais do grupo 2 meses.

Por outro lado, mesmo apresentando maior adiposidade e menor massa muscular relativa, aos 24 meses não foram detectadas mudanças na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose na comparação com animais mais jovens. Uma possibilidade para explicar esses dados é a observação da diferença da massa corporal entre os grupos de 2 e 13 meses ser aproximadamente 55% enquanto essa diferença entre os animais com 2 e 24 meses ser de aproximadamente 20%. Nesse sentido, a perda da massa corporal apresentada em uma fase mais avançada da vida pode ser responsável por reverter parte da resistência à insulina associada ao envelhecimento, uma vez que, como observado em alguns estudos, a redução da massa corporal pode contribuir com melhoras na sensibilidade à insulina¹⁰⁰, fator que aparentemente independe da idade.

5.1 A sarcopenia sob o aspecto do músculo EDL

Nossos resultados mostram que neste músculo, animais com 6 meses apresentam menor atividade do sistema ubiquitina-proteassoma na comparação com animais de 2 meses. A participação do sistema proteassomal nesta idade parece conferir aos animais adequado estado de manutenção da massa muscular, uma vez que apresentam a mesma massa muscular relativa que os animais de 2 meses.

Complementando estes dados, observou-se que aos 6 meses houve redução da expressão total da E3 ligase Atrogina 1, mesmo sem alteração na expressão da MuRF 1. Essas E3 ligases são determinantes para atividade proteassomal e podem definir quais proteínas, contráteis por parte da MuRF 1 e não contráteis por parte da Atrogina 1, serão preferencialmente direcionadas à proteólise^{67,68,101–103}. Nossos dados mostram que aos 6 meses sob condições basais, a Atrogina 1 parece ser mais importante para atividade do proteassoma pois, acompanhando sua expressão observa-se menor atividade do sistema. Além disso, verificamos que entre 2 e 6 meses, o equivalente conteúdo de proteínas Akt 1 e p70S6K proporciona a mesma capacidade de responder a estímulos anabólicos através destas vias. Sendo assim, acompanhando o crescimento

natural dos animais aos 6 meses (representado pela maior massa corporal), o *turnover* proteico que permite manutenção da massa muscular nesta idade parece ser decorrente de diminuição da atividade do sistema proteassomal, acompanhado de manutenção da capacidade de responder aos estímulos da síntese de proteínas.

Quando avaliamos esses parâmetros entre as idades de 2 e 13 meses foram observadas algumas semelhantes dos resultados porém, sob um cenário distinto. Apesar de exibirem menor atividade proteassomal, os animais aos 13 meses já apresentam significativa perda de massa e força musculares. Neste grupo também se detectou que o conteúdo da proteína Akt 1 estava diminuído em comparação aos pares mais jovens. Alguns estudos apontam a Akt como uma proteína chave na regulação de sinais hipertróficos e no bloqueio de sinais atroficos^{45,46}, sendo também conhecido em modelos de atrofia que estão reduzidos a expressão desta proteína e sinais propagados a partir dela¹⁰⁴. Em conjunto, tais resultados nos permite observar que a sarcopenia já observada aos 13 meses parece ser influenciada predominantemente por perdas da capacidade de responder adequadamente a possíveis estímulos anabólicos como, por exemplo, observados em períodos pós-prandiais. Attaix e colaboradores¹⁰⁵ propõem que um possível estado de “resistência a síntese proteica” que acompanha à idade pode contribuir para o desenvolvimento da sarcopenia. Diante da oferta de nutrientes ocorrem aumentos da síntese proteica em paralelo às reduções da proteólise, padrão que sofre mudanças com o envelhecimento. Dentre as alterações associadas aos avanços da idade observaram que há menor estimulação da síntese proteica e ausência ou menor bloqueio da degradação. Em conjunto, tais observações permitem entender, ao menos parcialmente, que a instalação de tais desequilíbrios contribuem para o surgimento de uma gradual e progressiva perda da massa muscular. Sendo assim, para músculos com características morfofuncionais semelhantes às do EDL, com predominância de fibras tipo II, menor capacidade para ativar a síntese proteica envolvendo a Akt 1 pode ser suficiente para causar o desequilíbrio no *turnover* proteico favorável à sarcopenia. Nessa idade houve interação do tratamento com DHEA que contribuiu para menor expressão da MuRF 1, mesmo sem haver relação desse efeito com a atividade do proteassoma, nem massa e força musculares.

Aos 24 meses, o significativo aumento da expressão de MuRF 1 associado a reduções das proteínas Akt 1 e p70S6K parece explicar parte do desequilíbrio proteico que resulta na sarcopenia desta idade. Alguns estudos mostram que a MuRF 1 está

associada a maior taxa de proteólise sobre proteínas do aparato contrátil, tais como titina e troponina I^{68,103}. Além disso, as menores expressões da Akt 1 e p70S6K podem representar uma perda ainda mais acentuada da capacidade de equilibrar a taxa de síntese à degradação proteica.

5.2 A sarcopenia sob o aspecto do músculo Sóleo

Há dados na literatura sugerindo que para cada tipo de fibras musculares existem sistemas proteolíticos principais que definem seu *turnover* proteico¹⁰⁶. Neste estudo avaliamos alguns dos fatores envolvidos na regulação da massa do músculo Sóleo, que tem como característica predominância de fibras tipo I. Dentre os fatores envolvidos avaliamos a atividade do proteassoma, que aos 6 meses foram semelhantes aos grupos 2 meses. Dentre as proteínas avaliadas observou-se apenas que Akt 1 exibiu queda de sua expressão. Considera-se bem estabelecido *in vitro*⁴² e *in vivo*¹⁰⁷ que a Akt exerce uma ação anabólica no músculo esquelético. No entanto, os efeitos do envelhecimento sobre seu papel anabólico ainda não foram completamente elucidados. Apesar do importante papel atribuído a esta proteína no balanço proteico, nossos resultados mostram que a menor expressão da Akt 1 em Wistars aos 6 meses não é suficiente para causar mudanças na massa relativa do músculo Sóleo na comparação com os pares mais jovens.

Por outro lado, a expressão reduzida da Akt 1 aos 13 meses, seguida por maior expressão da E3 ligase MuRF 1 no músculo Sóleo, em conjunto, parecem contribuir para o desbalanço proteico que reduz sua massa tecidual relativa. Em nosso estudo observamos que o aumento da expressão da MuRF 1 não foi responsável por aumentar a atividade do sistema proteolítico, pois houve equivalente atividade do complexo catalítico do sistema proteassomal entre os grupos de 2 e 13 meses. Este fato indica que para ratos com 13 meses, possíveis diminuições de sinais anabólicos podem ser o principal mecanismo responsável por redução da massa muscular relativa de músculos com predominância de fibras tipo I.

Em nosso estudo, também foram detectadas significativas reduções da massa do músculo Sóleo nos animais com 24 meses. Com base em nossos resultados, o quadro atrófico acompanhado pela menor expressão da Akt 1 parece ser preservado pela associação ao aumento da atividade catalítica proteassomal nesta idade. Nossos dados

corroboram com as observações de Attaix e colaboradores¹⁰⁵ de que animais senescentes exibem menores respostas a estímulos anabólicos e aumento de respostas proteolíticas, fatores que em conjunto, ajudam a esclarecer parte do aumento da erosão muscular associada ao avanço da idade.

A menor a atividade proteassomal observada no músculo EDL dos animais com 13 meses e maior no músculo Sóleo do grupo com 24 meses nos leva a levantar a hipótese de que cada sistema proteolítico participa de modo distinto em cada momento da vida dos animais. Poderiam, portanto, participar no mecanismo que levam às mudanças na massa muscular apresentadas em cada idade. Sendo assim, a participação do sistema ubiquitina-proteassoma como determinante para sarcopenia parece ser específica do tipo de fibra muscular e também da idade.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que ratos Wistar já apresentam importantes marcadores de sarcopenia a partir dos 13 meses de vida, caracterizando potencial modelo animal para estudos sobre os efeitos naturais do envelhecimento no tecido muscular esquelético. Também foi fruto de nossas observações que o protocolo para teste da força máxima voluntária utilizado é uma adequada ferramenta para avaliação do aspecto funcional motor de roedores em diferentes idades.

Nos músculos caracterizados pela redução de sua massa tecidual um fator comum observado foi representado pela reduzida expressão total da Akt 1, possivelmente sinalizando queda da capacidade anabólica, além de ser detectada variável grau de participação do sistema proteassomal de maneira músculo específica em cada idade avaliada. Também foi visto no presente estudo que o tratamento de 21 dias com DHEA não exerce efeitos sobre aspectos da sarcopenia de roedores em diferentes idades.

REFERÊNCIAS*

1. Evans WJ, Campbell WW. Sarcopenia and age-related changes in body composition and functional capacity. *J. Nutr.* 1993 fev;123(2 Suppl):465–8.
2. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012 set;3(3):163–79.
3. Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc.* 2011 maio;12(4):249–56.
4. Meng S-J, Yu L-J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1509–26.
5. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clin Nutr.* 2010 abr;29(2):154–9.
6. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 fev;87(2):589–98.
7. Morley JE, Perry HM 3rd. Androgens and women at the menopause and beyond. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2003 maio;58(5):M409–416.
8. Urban RJ, Bodenbun YH, Gilkison C, Foxworth J, Coggan AR, Wolfe RR, et al. Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 1995 nov;269(5 Pt 1):E820–826.
9. Sinha-Hikim I, Cornford M, Gaytan H, Lee ML, Bhasin S. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 ago;91(8):3024–33.
10. Roubenoff R, Hughes VA. Sarcopenia: current concepts. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2000 dez;55(12):M716–724.
11. Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, Kenny AM. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2002 dez;57(12):M772–777.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

12. Roubenoff R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 maio;6(3):295–9.
13. Moran A, Jacobs DR Jr, Steinberger J, Cohen P, Hong C-P, Prineas R, et al. Association between the insulin resistance of puberty and the insulin-like growth factor-I/growth hormone axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002 out;87(10):4817–20.
14. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and age-related endocrine function. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:127362.
15. Monier S, Le Cam A, Le Marchand-Brustel Y. Insulin and insulin-like growth factor I. Effects on protein synthesis in isolated muscles from lean and goldthioglucose-obese mice. *Diabetes*. 1983 maio;32(5):392–7.
16. Martineau LC, Chadan SG, Parkhouse WS. Age-associated alterations in cardiac and skeletal muscle glucose transporters, insulin and IGF-1 receptors, and PI3-kinase protein contents in the C57BL/6 mouse. *Mech. Ageing Dev*. 1999 jan 15;106(3):217–32.
17. Evans WJ, Paolisso G, Abbatecola AM, Corsonello A, Bustacchini S, Strollo F, et al. Frailty and muscle metabolism dysregulation in the elderly. *Biogerontology*. 2010 out;11(5):527–36.
18. Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D, Grizard J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J. Clin. Invest*. 1995 nov;96(5):2113–9.
19. Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schrøder HD, Handberg A. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes*. 2001 jun;50(6):1324–9.
20. Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WG, Zawadzki JK, et al. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J. Clin. Invest*. 1987 ago;80(2):415–24.
21. Kern M, Wells JA, Stephens JM, Elton CW, Friedman JE, Tapscott EB, et al. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem. J*. 1990 set 1;270(2):397–400.
22. Zierath JR, He L, Gumà A, Odegaard Wahlström E, Klip A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996 out;39(10):1180–9.
23. Kirkendall DT, Garrett WE Jr. The effects of aging and training on skeletal muscle. *Am J Sports Med*. 1998 ago;26(4):598–602.
24. Ploug T, Galbo H, Richter EA. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am. J. Physiol*. 1984 dez;247(6 Pt 1):E726–731.

25. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 2011 out;91(4):1447–531.
26. Grimby G, Danneskiold-Samsøe B, Hvid K, Saltin B. Morphology and enzymatic capacity in arm and leg muscles in 78-81 year old men and women. *Acta Physiol. Scand.* 1982 maio;115(1):125–34.
27. Punkt K, Mehlhorn H, Hilbig H. Region- and age-dependent variations of muscle fibre properties. *Acta Histochem.* 1998 fev;100(1):37–58.
28. Korach-André M, Gounarides J, Deacon R, Beil M, Sun D, Gao J, et al. Age and muscle-type modulated role of intramyocellular lipids in the progression of insulin resistance in nondiabetic Zucker rats. *Metab. Clin. Exp.* 2005 abr;54(4):522–8.
29. Kamel HK. Sarcopenia and aging. *Nutr. Rev.* 2003 maio;61(5 Pt 1):157–67.
30. Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am. J. Physiol.* 1997 out;273(4 Pt 1):E790–800.
31. Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 dez 24;93(26):15364–9.
32. Marcell TJ. Sarcopenia: causes, consequences, and preventions. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2003 out;58(10):M911–916.
33. Greenlund LJS, Nair KS. Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech. Ageing Dev.* 2003 mar;124(3):287–99.
34. Bevier WC, Wiswell RA, Pyka G, Kozak KC, Newhall KM, Marcus R. Relationship of body composition, muscle strength, and aerobic capacity to bone mineral density in older men and women. *J. Bone Miner. Res.* 1989 jun;4(3):421–32.
35. Piers LS, Soares MJ, McCormack LM, O'Dea K. Is there evidence for an age-related reduction in metabolic rate? *J. Appl. Physiol.* 1998 dez;85(6):2196–204.
36. Forbes GB. Longitudinal changes in adult fat-free mass: influence of body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999 dez;70(6):1025–31.
37. Ryan AS. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med.* 2000 nov;30(5):327–46.
38. Avignon A, Radauceanu A, Monnier L. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1997 dez;20(12):1822–6.
39. Soonthornpun S, Rattarasarn C, Leelawattana R, Setasuban W. Postprandial plasma glucose: a good index of glycemic control in type 2 diabetic patients having near-normal fasting glucose levels. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1999 out;46(1):23–7.

40. Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine*. 2012 jul 20;
41. Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem. Soc. Trans.* 2006 abr;34(Pt 2):213–6.
42. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 2001 nov;3(11):1009–13.
43. Hirsch E, Costa C, Ciraolo E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.* 2007 ago;194(2):243–56.
44. Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol. Scand.* 2005 jan;183(1):3–12.
45. Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 2003 fev;5(2):87–90.
46. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005 out;37(10):1974–84.
47. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004 mar 11;1697(1-2):3–16.
48. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.* 1997 out 17;272(42):26457–63.
49. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 fev 17;95(4):1432–7.
50. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* 2006 jun;31(6):342–8.
51. Lawrence JC Jr, Abraham RT. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 1997 set;22(9):345–9.
52. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 nov 23;294(5547):1704–8.
53. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 dez 4;98(25):14440–5.
54. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008 jun;23:160–70.

55. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell.* 2004 maio 7;14(3):395–403.
56. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 jun 13;113(6):685–700.
57. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005 jan;15(1):11–8.
58. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007 nov;8(11):931–7.
59. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010 abr;22(2):124–31.
60. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* 2009 dez;10(6):507–15.
61. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, et al. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 1989 mar 24;243(4898):1576–83.
62. Wing SS. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005 out;37(10):2075–87.
63. Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell.* 2001 set;8(3):499–504.
64. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001 mar;2(3):169–78.
65. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* 2001 mar 2;306(4):717–26.
66. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 2007 nov;6(5):376–85.
67. Tintignac LA, Lagirand J, Battonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 2005 jan 28;280(4):2847–56.
68. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Battonnet-Pichon S, Tintignac LA, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J.* 2008 abr 23;27(8):1266–76.

69. Labrie F. DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women. *Prog. Brain Res.* 2010;182:97–148.
70. Parker CR Jr. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids.* 1999 set;64(9):640–7.
71. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984 set;59(3):551–5.
72. Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, Perrelli M-G, Restivo F, Poli G, et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int.* 2003 set;64(3):836–43.
73. Campbell CSG, Caperuto LC, Hirata AE, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ, et al. The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo. *Life Sci.* 2004 nov 19;76(1):57–70.
74. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J. Biol. Chem.* 2002 jun 14;277(24):21379–88.
75. Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VPA, et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett.* 2006 jan 9;580(1):285–90.
76. Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, et al. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J. Endocrinol.* 2005 nov;187(2):169–96.
77. Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Mowa CN, et al. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007 fev;292(2):E577–584.
78. Aragno M, Mastrocola R, Catalano MG, Brignardello E, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes.* 2004 abr;53(4):1082–8.
79. Aragno M, Mastrocola R, Brignardello E, Catalano M, Robino G, Manti R, et al. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology.* 2002 set;143(9):3250–8.
80. Brown RC, Han Z, Cascio C, Papadopoulos V. Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Aging.* 2003 fev;24(1):57–65.

81. Morin C, Zini R, Simon N, Tillement JP. Dehydroepiandrosterone and alpha-estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. *Neuroscience*. 2002;115(2):415–24.
82. Murali B, Goyal RK. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. *Pharmacol. Res.* 2001 nov;44(5):385–9.
83. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989 fev;68(2):374–8.
84. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2000 jan;23(1):57–63.
85. Tarsitano CAB, Paffaro VA Jr, Pauli JR, Da Silva GH, Saad MJ, Salgado I, et al. Hepatic morphological alterations, glycogen content and cytochrome P450 activities in rats treated chronically with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Cell Tissue Res.* 2007 jul;329(1):45–58.
86. Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004 fev;29(1):16–31.
87. Lu H, Zong C, Wang Y, Young GW, Deng N, Souda P, et al. Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach. *Mol. Cell Proteomics*. 2008 nov;7(11):2073–89.
88. Cunha TF, Bacurau AVN, Moreira JBN, Paixão NA, Campos JC, Ferreira JCB, et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e41701.
89. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 ago 15;227(5259):680–5.
90. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992;24:145–9.
91. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 2010 jun 15;401(2):318–20.
92. Evans WJ. What is sarcopenia? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1995 nov;50 Spec No:5–8.
93. Kimball SR, O'Malley JP, Anthony JC, Crozier SJ, Jefferson LS. Assessment of biomarkers of protein anabolism in skeletal muscle during the life span of the rat:

- sarcopenia despite elevated protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004 out;287(4):E772–780.
94. Murakami H, Guillet C, Tardif N, Salles J, Migné C, Boirie Y, et al. Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is associated with muscle loss during aging. *Exp. Gerontol.* 2012 fev;47(2):129–35.
 95. Beyer I, Mets T, Bautmans I. Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012 jan;15(1):12–22.
 96. Li Y-P, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005 mar;19(3):362–70.
 97. Goran MI, Alderete TL. Targeting adipose tissue inflammation to treat the underlying basis of the metabolic complications of obesity. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2012;73:49–60.
 98. Kimura M, Tanaka S, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology.* 1998 jul;139(7):3249–53.
 99. Richards RJ, Porter JR, Svec F. Serum leptin, lipids, free fatty acids, and fat pads in long-term dehydroepiandrosterone-treated Zucker rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000 mar;223(3):258–62.
 100. Petersen KF, Dufour S, Morino K, Yoo PS, Cline GW, Shulman GI. Reversal of muscle insulin resistance by weight reduction in young, lean, insulin-resistant offspring of parents with type 2 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 maio 22;109(21):8236–40.
 101. Li H-H, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang D-Z, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J. Clin. Invest.* 2004 out;114(8):1058–71.
 102. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 dez 28;101(52):18135–40.
 103. McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.* 2002 abr 1;157(1):125–36.
 104. Sugita H, Kaneki M, Sugita M, Yasukawa T, Yasuhara S, Martyn JAJ. Burn injury impairs insulin-stimulated Akt/PKB activation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005 mar;288(3):E585–591.

105. Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP, Grizard J. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005 out;37(10):1962–73.
106. Shi H, Scheffler JM, Zeng C, Pleitner JM, Hannon KM, Grant AL, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2009 maio;296(5):C1040–1048.
107. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 2001 nov;3(11):1014–9.