MÁRIO ALVES DE SIQUEIRA FILHO

**Músculo esquelético e envelhecimento: vias de
sinalização da insulina e IGF 1 nos diferentes tipos de
fibras musculares, perfil morfológico e efeito do DHEA
em ratos apresentando sarcopenia**

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

São Paulo
2008

MÁRIO ALVES DE SIQUEIRA FILHO

**Músculo esquelético e envelhecimento: vias de
sinalização da insulina e IGF 1 nos diferentes tipos de
fibras musculares, perfil morfológico e efeito do DHEA
em ratos apresentando sarcopenia**

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

Área de concentração:
Fisiologia Humana

Orientadora:
Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

São Paulo
2008

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.

Músculo esquelético e envelhecimento: vias de sinalização da insulina e IGF 1 nos diferentes tipos de fibras musculares, perfil morfológico e efeito do DHEA em ratos apresentando sarcopenia / Mário Alves de Siqueira Filho. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Sinalização intracelular da insulina (Fisiologia endócrina).

Versão do título para o inglês: Skeletal muscle and insulin action: intracellular pathway in type 1 and type 2 muscle fibers, morphological pattern, and effect of DHEA in sarcopenic rats.

Descritores: 1. Desidroepiandrosterona (DHEA) 2. Insulina 3. Músculo esquelético 4. Tipos de fibra 5. Envelhecimento 6. Sarcopenia 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/SBIB194/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mário Alves de Siqueira Filho.

Título da Dissertação: Músculo esquelético e envelhecimento: vias de sinalização da insulina e IGF 1 nos diferentes tipos de fibras musculares, perfil morfológico e efeito do DHEA em ratos apresentando sarcopenia.

Orientador(a): Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 grandioza maneira como consegue motivar;

Ao amigo Ricardo Zanuto por simbolizar o início de minha história Acadêmica, por compartilhar uma respeitosa amizade e por quem cultivo enorme admiração;

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;

Aos colegas de laboratório: João Paulo, Luciana Caperuto, Eliana Akamine, Teca, Anderson, José Edgar, Gabriel Anhê, Nelo Zanchi... por serem fundamentais para que eu chegasse até aqui, colaborando com explicações, sugestões, críticas, ajudas de bancada e pelo clima de descontração nas rotinas de laboratório;

Ao Prof. Anselmo Moriscot, Igor Batista e colaboradores de seu laboratório por contribuir com as análises histoquímicas e sugestões no desenvolvimento deste trabalho;

Aos Professores Silvana Bordin, Maria Tereza, Lisete Michelini, Silvia Boldrini, Edson Liberti, Ângelo Carpinelli, Rui Curi, Fábio Bessa, Luiz Roberto de Britto e colaboradores de seus laboratórios;

Ao Prof. Anibal Vercesi e Natália Inada (UNICAMP – Campinas) por importantes ensinamentos e colaborações;

Aos grandes amigos Ivson Galvão, Halisson Santos, Sérgio Cahú, Paulo Figueiredo, Guilherme Falcão, Emerson Damásio, Diogo Duarte por todo apoio que deram encorajando a continuação desta busca profissional;

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 e FAPESP.

RESUMO

Siqueira Filho MA. Músculo esquelético e envelhecimento: vias de sinalização da insulina e IGF 1 nos diferentes tipos de fibras musculares, perfil morfológico e efeito do DHEA em ratos apresentando sarcopenia [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A perda de massa e força musculares com o envelhecimento é uma condição altamente prevalente entre os adultos mais velhos e está associada a uma série de doenças, incluindo obesidade, resistência à ação da insulina e diabetes melito tipo 2. O músculo esquelético é o maior tecido responsável pela captação da glicose e dos ácidos graxos após uma refeição e a redução de sua massa tecidual pode contribuir para alterações da homeostase glicêmica. O músculo é constituído por tipos de fibras que lhe confere diferentes respostas metabólicas, bem como diferenças na sensibilidade e responsividade à insulina. Com o avanço da idade há declínio da taxa de síntese da cadeia pesada da Miosina e perda de proporção e tamanho de tipos preferenciais de fibra nesse tecido. Declínios da força muscular e dos níveis circulantes de testosterona em homens e de IGF 1 e desidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S) em ambos os gêneros, estão associados a reduções da síntese protéica. Estudos demonstram que a reposição com DHEA em humanos e modelos animais promove aumento da sensibilidade à insulina. OBJETIVOS: Caracterizar a expressão das proteínas intracelulares envolvidas na síntese protéica e investigar o efeito do tratamento com DHEA, sobre essas proteínas, em músculos esqueléticos de ratos adultos com 12-14 meses de idade. METODOS: Análise da expressão protéica e do grau de fosforilação por *immunoblotting* e medidas da proporção e do tamanho dos tipos de fibras através da histoquímica dos músculos Sóleo e Extensor digital longo (EDL). RESULTADOS: Observa-se que músculo com predominância de fibras tipo 1 (Sóleo) apresenta maior conteúdo protéico de IR- β $77\pm 3\%$ e Akt 1 $75\pm 5\%$ ($p<0,0001$), ERK 1 $38\pm 8\%$ ($p<0,05$), PGC 1 α 68 ± 10 ($p<0,01$) e maior intensidade do grau de fosforilação da p70S6K, enquanto músculo com predominância de fibras tipo 2 (EDL) exibe maior expressão protéica de IGF1R $44\pm 17\%$, IRS 2 $33\pm 8\%$ e p85PI3-K $52\pm 8\%$ ($p<0,05$), e apresenta importante indicador de sarcopenia observado por redução na proporção e tamanho médio ($41\pm 6\%$ e $72 \pm 3\%$ respectivamente, $p<0,001$) das fibras tipo 2b. Além disso, o tratamento por uma semana com DHEA não promoveu qualquer alteração tanto na sensibilidade à ação da insulina, quanto na expressão e fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina dos músculos Sóleo e EDL, mas induziu uma redução do tamanho médio ($74 \pm 6\%$, $p<0,05$) das fibras tipo 1 no EDL. Esses dados indicam que há regulação músculo-específica em vias da insulina e IGF 1 em músculos constituídos por populações distintas de tipos de fibras, que ratos Wistar com 12-14 meses de idade apresentam indicadores de sarcopenia e que o tratamento com DHEA não é capaz de modular essas vias, apesar de induzir mudanças morfológicas com significado fisiológico ainda desconhecido.

Palavras-chave: Desidroepiandrosterona; Insulina; Músculo esquelético; Tipos de fibra; Envelhecimento; Sarcopenia.

ABSTRACT

Siqueira Filho MA. Skeletal muscle and insulin action: intracellular pathway in type 1 and type 2 muscle fibers, morphological pattern, and effect of DHEA in sarcopenic rats [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Reductions in skeletal muscle mass and strength are highly prevalent in aging and are related to several diseases such as obesity, insulin resistance and type II diabetes. After meal ingestion, glucose and fatty acids uptake are mainly performed by skeletal muscles. Thus, reductions in skeletal muscle mass can exert profound influences and even impair the glycaemic homeostasis. The skeletal muscle is constituted by different fiber types, resulting in both, different metabolic responses and insulin sensibility. With aging, it is observed a decrement in myosin heavy chain protein synthesis, as well as preferential decrements in muscle fiber type size and composition. Decreases in skeletal muscle strength and testosterone levels in men, and IGF 1 and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in both genders are highly correlated with reductions in skeletal muscle protein synthesis. Importantly, several studies have demonstrated that DHEA reposition in both, animals and humans, can promote increases on insulin sensitivity. **OBJECTIVES:** To characterize the effects of DHEA treatment on expression of intracellular proteins involved in muscle protein synthesis in either, Soleus and Extensor digitorum longus (EDL) muscle of 12-14 month old rats. **METHODS:** Determination of protein expression and phosphorylation levels by typical immunoblotting and measurements of muscle fiber size and composition through histochemical methods were done in both, Soleus and EDL muscle. **RESULTS:** It was observed that skeletal muscle groups predominantly composed of type 1 fibers shows increased protein content of IR- β $77\pm 3\%$ and Akt 1 $75\pm 5\%$ ($p<0.0001$), ERK 1 $38\pm 8\%$ ($p<0.05$), PGC 1α 68 ± 10 ($p<0.01$) and accompanied by increased phosphorylation levels of the p70S6K protein, whereas skeletal muscle predominantly composed of type 2 fibers exhibits increased protein expression of IGF 1R $44\pm 17\%$, IRS 2 $33\pm 8\%$ and p85PI3-K $52\pm 8\%$ ($p<0.05$). Moreover, DHEA treatment (one week) did not promote alterations in protein expression and phosphorylation levels of insulin signaling pathway and histological variables, but decreased the mean fiber caliber ($74 \pm 6\%$, $p<0.05$) of type 1 fibers in EDL muscle. These results indicate there are a fiber type muscles specific regulation of intracellular pathways modulated by insulin and IGF-1. It is also possible to suggest that 12-14 month old rats present sarcopenia and that DHEA treatment does not alter such pathways although DHEA treatment induced morphological alterations with physiological meaning yet unknown.

Keywords: Dehydroepiandrosterone; Insulin; Skeletal muscle; Fiber types; Aging; Sarcopenia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt 1	Proteína quinase B isoforma 1
Akt 2	Proteína quinase B isoforma 2
Akt 3	Proteína quinase B isoforma 3
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHEA-S	Desidroepiandrosterona sulfatada
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Sistema de detecção de quimioluminescência (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ERKs	Quinases reguladoras da sinalização extracelular
NRF 1	<i>Nuclear respiratory factors 1</i>
NRF 2	<i>Nuclear respiratory factors 2</i>
GLUT 4	Transportador para glicose isoforma 4
GRB2	Proteína ligadora 2 do receptor para fator de crescimento
IGF 1	Fator 1 de crescimento semelhante à insulina
IGF 1R	Receptor para o fator 1 de crescimento semelhante à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS 1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS 2	Substrato 2 do receptor de insulina
K_{itt}	Constante de decaimento da glicose
MAPK	Proteína quinase ativadora da mitogênese
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Nck	Proteína adaptadora ligada às vias de crescimento
Foxo1	Fator de transcrição 1 da família FoxO
Foxo 3a	Fator de transcrição 3a da família FoxO
MAFbx	<i>Muscle atrophy F box</i>
MuRF1	<i>Muscle RING finger 1</i>
PGC 1	Coativador do receptor nuclear de PPAR γ
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Sódio dodecil-sulfato
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida e sódio dodecil-sulfato para eletroforese
SH2	Segunda homologia ao Src
SH-PTP2	Fosfotirosina fosfatase ativada pelo IRS1 fosforilado em tirosina
S6K (p⁷⁰)	Proteína ribossomal S6
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Grau de fosforilação de proteínas nos músculos Sóleo e EDL de ratos com 2-3 meses de idade, nos diferentes tempos após infusão de insulina	30
Figura 2 - Expressão de proteínas entre os músculos Sóleo e EDL de animais com 12-14 meses de idade	31
Figura 3 - Expressão e fosforilação de proteínas no músculo Sóleo de ratos com 12-14 meses de idade com administração ou não de desidroepiandrosterona	33
Figura 4 - Expressão e fosforilação de proteínas no músculo EDL de ratos com 12-14 meses de idade com administração ou não de desidroepiandrosterona	34
Figura 5 - Corte histológico do músculo Sóleo	36
Figura 6 - Corte histológico do músculo EDL	37
Figura 7 - Média relativa ($\mu\text{m}^2/\text{g}$) da área de secção transversa dos tipos de fibras do músculo Sóleo	39
Figura 8 - Média relativa ($\mu\text{m}^2/\text{g}$) da área de secção transversa dos tipos de fibras do músculo EDL	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos animais de 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade tratados com veículo (controle) ou DHEA	28
Tabela 2 - Proporção dos tipos de fibra no músculo Sóleo de animais com 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade controles e tratados com DHEA	38
Tabela 3 - Proporção dos tipos de fibra no músculo EDL de animais com 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade controles e tratados com DHEA	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DHEA e metabolismo energético no envelhecimento	19
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 Materiais	23
3.3 Métodos	24
3.3.1 Administração de DHEA	24
3.3.2 Índice de decaimento da glicose (K_{it})	24
3.3.3 Extração das proteínas totais dos músculos esqueléticos	24
3.3.4 Análise protéica por <i>Immunoblotting</i>	25
3.3.5 Histoquímica da ATPase de Miosina	26
3.3.5.1 Área de secção transversa	27
3.3.6 Análise estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Características dos animais	28
4.2 Evolução temporal (<i>Time course</i>)	29
4.3 Comparação dos níveis protéicos entre os músculos Sóleo e EDL	31
4.4 Efeito do DHEA sobre a expressão de proteínas nos músculos Sóleo e EDL	32
4.5 Histoquímica da ATPase de Miosina	35
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A maior parte do carboidrato ingerido que entra no sistema circulatório é absorvido por tecidos periféricos (Meyer *et al.*, 2002) e o local predominante de captação desta glicose é o músculo esquelético. Esta corresponde, aproximadamente, a $\frac{1}{4}$ do carboidrato ingerido (Firth *et al.*, 1986; Jackson *et al.*, 1986; Kelley *et al.*, 1988; McMahon, Marsh e Rizza, 1989; Butler *et al.*, 1991; Mitrakou *et al.*, 1992; Kelley *et al.*, 1994), e as diminuições da proporção de massa muscular corporal podem contribuir para alterações da homeostase glicêmica (Avignon *et al.*, 1997; Soonthornpun *et al.*, 1999).

O tecido muscular esquelético é constituído por fibras de contração lenta (oxidativas ou tipo 1) e fibras de contração rápida (não oxidativas ou tipo 2) (Gaster *et al.*, 2001). As fibras tipo 1 são pequenas, produzem baixa tensão mas são altamente resistentes à fadiga porque possuem grandes e numerosas mitocôndrias e são efetivas em metabolizar gordura, enquanto as fibras tipo 2 são maiores, produzem uma enorme tensão, mas apresentam uma pobre resistência à fadiga, além da existência de fibras intermediárias que apresentam características intermediárias às anteriormente citadas (Kirkendall e Garrett, 1998). Outras particularidades que se somam ao tecido muscular são a maior sensibilidade e responsividade à insulina por parte das fibras tipo 1 (Lillioja *et al.*, 1987; Kern *et al.*, 1990; Kriketos *et al.*, 1996; Zierath *et al.*, 1996), enquanto observa-se maior sensibilidade à contração por parte das fibras tipo 2 (Ploug, Galbo e Richter, 1984).

O músculo esquelético é um tecido dinâmico que passa constantemente por um processo de troca de suas proteínas pela síntese de outras utilizando novos aminoácidos. Essa troca é resultado da constante taxa de síntese e degradação protéicas sugerindo que, aproximadamente, 65 a 80% dos aminoácidos são ressintetizados por este processo chamado *turnover* protéico (Mader, 1988), com fundamental importância para determinar a quantidade de proteínas do tecido, mas também para manter sua qualidade ao remover moléculas danificadas e as substituir por novas (Welle, 2002).

Enquanto o aumento da atividade proteolítica pode resultar na atrofia do tecido muscular, aumentos da taxa de síntese protéica podem resultar no aumento desse tecido - hipertrofia (Glass, 2003). Para atividade proteolítica, a ativação da caspase-3 durante a atrofia é um mecanismo envolvido nos passos iniciais da fragmentação de miofibrilas ou complexo Actina-Miosina (Du *et al.*, 2004). Estes fragmentos podem ser degradados pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Kandarian e Jackman, 2006), cujas enzimas substrato-específico do

processo de ubiquitinação, ubiquitinas-ligasas músculo-específicas, sofrem *upregulation* em condições atroficas (Bodine *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001).

Por outro lado, a insulina (Proud, 2006) e o fator 1 de crescimento semelhante à insulina - o IGF 1 (Bodine *et al.*, 2001; Rommel *et al.*, 2001) 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 protéica.

A PI3-K (fosfatidilinositol-3 quinase) é uma quinase de lipídeos composta por duas subunidades constitutivamente associadas: a regulatória de 85 kilodaltons (kDa) e a subunidade catalítica de 110 kDa (Hirsch, Costa e Ciraolo, 2007). A subunidade regulatória age como uma adaptadora que liga a subunidade catalítica a outros elementos na via de sinalização (Shepherd, 2005).

Após ativação da PI3-K, há estimulação de serina/treoninas quinases dependentes de PIP₃, entre elas, quinases dependentes de fosfoinosítídeos 1 e 2 (PDK 1 e 2), com subsequente estimulação da proteína Akt envolvida em efeitos como síntese lipídica (Kitamura *et al.*, 1999), de glicogênio (Burgering e Coffey, 1995; Cross *et al.*, 1995), translocação de GLUT 4 (Calera *et al.*, 1998), sobrevivência celular (Datta, Brunet e Greenberg, 1999) e síntese de proteínas (Alessi e Downes, 1998; Scott *et al.*, 1998).

Etapas regulatórias importantes da síntese protéica envolvem o início da tradução gênica regulada pela via intracelular Akt/mTOR/p70S6K (Fingar e Blenis, 2004). Evidências para esta via surgiram após observações de que as proteínas Tsc1-Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 1 e 2) podem inibir a mTOR (Inoki *et al.*, 2002; Tee *et al.*, 2002). Nesta via, a Akt fosforila a proteína Tsc2 ativando a mTOR, pelo menos em parte, por romper o complexo Tsc1-Tsc2 (Inoki *et al.*, 2002). Em células estimuladas por insulina a ativação da p70S6K se mostrava inibida diante de aumentos da expressão do complexo Tsc1-Tsc2 (Inoki *et al.*, 2002; Tee *et al.*, 2002).

A mTOR pode aumentar a síntese protéica no músculo esquelético modulando, no mínimo, duas vias distintas, a via p70S6K e a via da proteína PHAS-1 (também chamada 4E-BP) que age como um regulador negativo do fator de iniciação eIF-4E (Hara *et al.*, 1997; Proud, 2004). Porém, a mTOR parece ter uma função importante e central na integração de uma variedade de sinais de crescimento, desde ativação por fatores de crescimento protéicos e insulina que resultam na síntese protéica, até simples estímulos nutricionais (Glass, 2005), como é o caso dos aminoácidos provenientes da dieta que também são capazes de ativar

diretamente a proteína mTOR, causando uma subsequente ativação da p70S6K (Hara *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998).

Em adultos jovens, observa-se um equilíbrio entre a síntese e degradação de suas proteínas, sem que mudanças na massa muscular esquelética sejam observadas (Volpi *et al.*, 2001). Entretanto, a perda de massa muscular, acompanhada de reduções da força e resistência musculares, presente no envelhecimento é chamada de sarcopenia (Evans, 1995).

Fatores como inatividade física, doenças e o envelhecimento podem representar condições potenciais que levam à atrofia da massa muscular, cujas consequências funcionais e morfológicas comuns de todas as formas de atrofia são diminuída área de secção transversa da fibra muscular e seu conteúdo protéico, redução da força e potência, aumento da fadigabilidade e aumento de resistência à ação da insulina (Kandarian e Jackman, 2006).

Com particular interesse na relação com o envelhecimento, as mudanças na massa muscular tem representado um problema de saúde devido à perda da mobilidade e força associada à redução dessa massa (Greenlund e Nair, 2003). Ademais, há declínio gradual da densidade óssea (Bevier *et al.*, 1989), diminuição da taxa metabólica basal (Piers *et al.*, 1998), queda da captação máxima de oxigênio (Roubenoff e Hughes, 2000), mudanças na composição corporal com aumento na adiposidade (Forbes, 1999), aparecimento de resistência à ação da insulina (Ryan, 2000) e aumento na incidência de diabetes melito tipo 2 (Avignon *et al.*, 1997; Soonthornpun *et al.*, 1999).

Alguns fatores podem levar à sarcopenia, entre eles: perda regular da atividade física diária ou da função neuromuscular, mudanças no metabolismo protéico, alterações endócrinas ou da expressão gênica e apoptose celular (Marcell, 2003).

No envelhecimento há alterações nas fibras musculares do tipo 2 que têm seu tamanho reduzido, enquanto que as fibras do tipo 1 são muito menos afetadas tanto em humanos (Grimby *et al.*, 1982) quanto em modelos animais (Punkt, Mehlhorn e Hilbig, 1998; Korach-Andre *et al.*, 2005). Ademais, há redução também no número de fibras (Kamel, 2003) e na síntese de proteínas (Rooyackers *et al.*, 1996; Balagopal *et al.*, 1997) acompanhada do acúmulo de proteínas não funcionais (Marcell, 2003).

A taxa de síntese da cadeia pesada da Miosina foi correlacionada com medidas da força muscular, níveis circulantes de IGF 1, desidroepiandrosterona na forma sulfatada (DHEA-S) em homens e mulheres e testosterona em homens (Basu, Basu e Nair, 2002). Comparados às pessoas jovens, os idosos apresentam uma maior proporção de tecido fibroso na massa muscular e menor tecido metabolicamente ativo com um maior conteúdo líquido

(LaMarco *et al.*, 1991). Além disso, o acúmulo de proteínas não funcionais que não são eficientemente removidas do músculo em associação ao envelhecimento pode aumentar a quantidade de material não contrátil neste tecido, e isso pode explicar porque a força muscular declina em maior grau comparado à perda de sua massa no processo da sarcopenia (Grune *et al.*, 2001).

Reduções da massa muscular e dos níveis de atividade física contribuem para diminuição do gasto energético total em uma pessoa idosa. A massa muscular é responsável por aproximadamente 30% do gasto energético no estado de repouso e a atividade física pode contribuir variavelmente entre 10-60% do gasto energético total diário (Evans, 1997; Greenlund e Nair, 2003). Nesse contexto, pessoas adultas podem ter um ganho de aproximadamente 0,5 kg de massa adiposa ao ano entre as idades de 30 e 60 anos, e uma concomitante perda da massa muscular esquelética de, aproximadamente, 0,25 kg por ano no mesmo intervalo de tempo (Forbes, 1999). Assim, a redução do gasto energético total pode contribuir para o aumento do tecido adiposo total, especialmente o acúmulo de gordura abdominal. Essas alterações na composição corporal apresentam correlação com o aparecimento da resistência à ação da insulina, contribuindo com aumento da prevalência do diabetes tipo 2, hiperlipidemia e hipertensão na população geneticamente susceptível (Nair *et al.*, 2006).

Estudos com ratos de 20 meses de idade mostraram resistência à ação da insulina (Nishimura *et al.*, 1988) e diminuída síntese do glicogênio muscular (Goodman *et al.*, 1983), sem alteração na ligação da insulina com seu receptor em músculos esqueléticos isolados, sugerindo que o defeito celular associado à resistência insulínica do envelhecimento seria um evento pós-receptor. A sinalização da insulina fica comprometida com o avanço da idade, entre outros fatores, por uma associada redução da expressão do IRS 1 em tecidos como o muscular esquelético (Carvalho *et al.*, 1996) e tecido adiposo (Caperuto *et al.*, 2006) e por uma redução do grau de fosforilação do IRS 2 em fígado, músculo e tecido adiposo, acompanhada de redução da associação com a PI3-K (Carvalho *et al.*, 2000; Caperuto *et al.*, 2006). Além disso, a depleção do “pool” intracelular do transportador de glicose - o GLUT 4, foi observada em músculos esqueléticos de ratos com 10 meses (Gulve *et al.*, 1993). Ainda que seja observada uma redução da captação de glicose em ratos à medida que envelhecem, esta diminuição é muito marcante entre 2 e 4 meses de idade, sendo menos expressiva nos meses seguintes (Goodman *et al.*, 1983; Nishimura *et al.*, 1988).

Estas proteínas são envolvidas com os sinais intracelulares da insulina que apresenta papel central na homeostase energética, crescimento e sobrevivência celular, atuando em praticamente todas as células através de modificação na expressão ou atividade de uma série de enzimas e sistemas de transporte.

Os passos iniciais da ação da insulina envolvem a ligação do hormônio ao seu receptor específico de membrana plasmática (Cheatham e Kahn, 1995). O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína tetramérica constituída por duas subunidades α , cada uma com 135.000 Daltons e unidas entre si por ligação dissulfeto, com localização inteiramente extracelular possuindo o sítio de ligação da insulina; e por duas subunidades β , cada uma com 95.000 Daltons unidas às subunidades α por ligações dissulfeto e com localização transmembrana, sendo as responsáveis pela transmissão do sinal em direção ao citoplasma (Kahn, 1985). As subunidades β são proteínas com atividade quinase de tirosinas capazes de se autofosforilar e de fosforilar outros substratos em resíduos de tirosina após a ligação do hormônio à subunidade α (Kasuga, Karlsson e Kahn, 1982). A ligação da insulina induz uma mudança conformacional em seu receptor capaz de ligar ATP às subunidades β no domínio intracelular. O ATP ligado ativa a autofosforilação do receptor o qual, em parte, é capaz de ativar quinases do receptor em direção a substratos intracelulares (Hubbard *et al.*, 1994; Hubbard, 1997).

Os substratos endógenos do IR são rápida e diretamente fosforilados em tirosina pela ativação do receptor (Bernier *et al.*, 1987). O primeiro destes substratos foi chamado de IRS 1 (substrato 1 do receptor de insulina) de localização citoplasmática e possuindo muitos sítios de fosforilação em serina, treonina e tirosina (Sun *et al.*, 1991). Essa proteína é crucial no processo de transmissão do sinal insulínico, localizada estrategicamente na fase inicial da sinalização e, atuando como proteína ancoradora capaz de ativar diversas enzimas.

O IRS 2 apresenta homologia estrutural e na distribuição tecidual ao IRS 1 (Sun *et al.*, 1995). Há evidências de que o IRS 1 é o principal substrato do receptor em músculos, enquanto que o IRS 2 tem papel central no fígado, ilhotas pancreáticas e sistema nervoso central (Withers *et al.*, 1998; Kulkarni *et al.*, 1999; Kido *et al.*, 2000).

Estímulo com insulina induz associação e ativação entre IRS 1 e 2 com a PI3-K (Folli *et al.*, 1992), e a associação do IRS 1 com a PI3-K é essencial para o transporte de glicose no tecido adiposo (Clarke *et al.*, 1994), no muscular e para síntese de glicogênio e controle do crescimento celular na maioria dos tecidos (Tsakiridis *et al.*, 1995). A ativação da PI3-K é um evento intracelular inicial e crítico em resposta a uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e hormônios incluindo a insulina (Stephens, Jackson e Hawkins, 1993;

Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Uma vez ativada, a PI3-K fosforila os fosfatidilinositol 4,5-bifosfato de membrana produzindo fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato – os PIP₃ (Vivanco e Sawyers, 2002; Matsui *et al.*, 2003) resultando em um rápido aumento nos níveis destes PIP₃ que ocorre em todas as células estimuladas por insulina (Alessi e Downes, 1998). A jusante à ativação da PI3-K há uma variedade de respostas incluindo translocação de GLUT 4 (Clarke *et al.*, 1994; Kotani *et al.*, 1995), síntese de glicogênio (Sakaue *et al.*, 1995; Shepherd, Nave e Siddle, 1995), inibição de lipólise (Rahn *et al.*, 1994; Wijkander *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999) e estimulação da síntese protéica (Cheatham *et al.*, 1994).

A Akt, a jusante da PI3-K, é representada por três isoformas (Akt 1 ou PKB α , Akt 2 ou PKB β e Akt 3 ou PKB γ) tanto em roedores quanto em humanos, codificadas por genes distintos (Coffer, Jin e Woodgett, 1998; Murthy *et al.*, 2000), mas apresentam homologia com características bioquímicas similares (Coffer, Jin e Woodgett, 1998). A Akt 1 desempenha um papel importante na regulação do crescimento celular (Chen *et al.*, 2001; Brozinick Jr, Roberts e Dohm, 2003), enquanto que as isoformas Akt 2 e 3 estão mais envolvidas no metabolismo da glicose (Brozinick Jr, Roberts e Dohm, 2003).

Alvos da Akt incluem, entre outras, proteínas regulatórias chaves envolvidas na tradução e síntese protéica - mTOR, p70S6K e PHAS 1 (4E-BP 1) (Cross *et al.*, 1995; Scott e Lawrence Jr, 1998; Nave *et al.*, 1999), bem como, proteínas da família dos fatores de transcrição FOXO responsáveis pela *upregulation* de ubiquitina ligases envolvidas com a via proteolítica (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). A Akt inibe de maneira predominante a indução de sinais atróficos promovidos pela via proteolítica ubiquitina-proteassoma, prevenindo a indução de mediadores atróficos - ubiquitina ligases MuRF 1 e MAFbx (Stitt *et al.*, 2004), também conhecida como Atrogina 1 (Gomes *et al.*, 2001).

Em miotubos, os fatores transcricionais FOXO são excluídos do núcleo quando a Akt está fosforilada, porém translocam de volta sob desfosforilação para ativar genes envolvidos no processo de morte celular, inibição do ciclo celular e metabolismo (Tran *et al.*, 2003). Em ratos transgênicos com expressão aumentada de FOXO1 foi possível observar um fenótipo de atrofia muscular (Kamei *et al.*, 2004), e a ativação da FOXO3a foi capaz de induzir sinais atróficos (Sandri *et al.*, 2004). É possível que haja uma relação entre a ativação deste fatores transcricionais na patogênese da sarcopenia e sua associação com obesidade e diabetes (Kamei *et al.*, 2004).

Outra importante via que participa na resposta celular à insulina é a via mitogênica ras-raf 1-MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Avruch, 1998). A proteína Grb 2

contém duas porções SH3 e uma SH2 e apresenta a capacidade de se ligar ao IRS 1 (Cheatham e Kahn, 1995). A Grb 2 age como uma molécula adaptadora que liga o fator permutador de guanina à p21ras, chamado mSOS (son-of-sevenless), a fosfoproteínas como o receptor do EGF e o IRS 1. O complexo Grb/mSOS ativa a p21ras, estimulando a ligação de GTP. Por analogia, a interação do complexo Grb/mSOS ao IRS 1 pode mediar a estimulação da p21ras pela insulina. A proteína ras se liga à raf 1 que fosforila e ativa as MAPKs, via relacionada com o crescimento, diferenciação e proliferação celular (Avruch, 1998). O estresse celular, citocinas, fatores de crescimento e insulina induzem mudanças na atividade dos vários membros da família das MAPKs, cuja cascata de sinalização pode ser subdividida em algumas vias mediadas por proteínas como ERKs 1 e 2 (extracelullar signal-regulated quinases), MAPK p³⁸ e JNK (c-Jun NH₂-terminal quinases) (Widegren, Ryder e Zierath, 2001).

Além do papel das MAPKs no crescimento celular, há evidências de seu envolvimento na regulação da atividade do principal controlador da biogênese mitocondrial - o PGC 1, que é responsável por estimular a transcrição gênica agindo como um co-ativador transcricional que não se liga diretamente ao DNA, mas aos fatores de transcrição já ligados ao DNA em seqüências ou elementos de reconhecimento específicos (Knutti, Kressler e Kralli, 2001). Os níveis de PGC 1 α apresentam relação com o conteúdo mitocondrial muscular quando se comparam os tipos de fibra (Lin *et al.*, 2002), das quais merecem destaque as fibras musculares tipo 1 que possuem alta densidade de mitocôndrias e apresentam metabolismo aeróbico predominante (Kirkendall e Garrett, 1998; Gaster *et al.*, 2001). Por outro lado, não está completamente esclarecido se a expressão de proteínas envolvidas nessas vias de sinalização intracelular relacionadas a síntese proteica é semelhante nos tecidos musculares com predominância de tipos de fibras distintos.

1.1 DHEA e metabolismo energético no envelhecimento

Com o envelhecimento existe um declínio dos níveis circulantes de diversos hormônios, incluindo hormônio do crescimento, IGF 1, DHEA, testosterona, estradiol e progesterona (Arlt e Hewison, 2004).

A conversão de DHEA à andrógenos ou estrógenos pelos tecidos periféricos passou a ser chamada de intracrinologia, e este fenômeno representa a ação de enzimas esteroidogênicas específicas capazes de produzir localmente os esteróides à medida que se

tornam necessários dentro da célula, sem que isso resulte em aumento nos níveis sanguíneos de andrógenos ou estrógenos (Labrie, 1991).

A síntese de DHEA e DHEA-S é baixa ou quase nula nos mamíferos, exceto em primatas (Cutler *et al.*, 1978). A produção desse hormônio está elevada durante o desenvolvimento neonatal pelo feto, diminui rapidamente após o nascimento, aumenta na idade infantil entre os 6 e 8 anos de idade (Labrie *et al.*, 2005) depois da qual volta a expressar baixos níveis até a fase adolescente. Por volta da segunda década de vida, entre os 20 e 30 anos, os níveis deste hormônio aumentam e chegam a seus valores máximos (Labrie *et al.*, 1997), apresentando diferenças entre os gêneros com concentrações sanguíneas maiores no homem (Rainey *et al.*, 2002). Depois desta fase os níveis de DHEA e DHEA-S começam a declinar novamente (Labrie *et al.*, 1997) e a partir da sétima década de vida, observam-se os níveis mais baixos de sua concentração sanguínea.

Esse declínio tem sido chamado de adrenopausa, apesar da secreção de cortisol não se alterar consideravelmente com o envelhecimento (Laughlin e Barrett-Connor, 2000). A queda nos níveis de DHEA-S mostra uma alta variabilidade entre os indivíduos e parece estar associada a redução do tamanho da zona reticular da glândula adrenal (Parker *et al.*, 1997). A adrenopausa é independente da menopausa e ocorre em ambos os gêneros. Enquanto as concentrações séricas de DHEA-S não variam durante todo o dia, a secreção de DHEA acompanha um ritmo diurno similar ao do cortisol. Liu e colaboradores (1990) observaram uma atenuação do ritmo diurno e amplitude de pulso da secreção de DHEA em curso do envelhecimento. Além disso, a secreção de DHEA induzida pelo hormônio adrenocorticotrófico hipofisário foi reduzida em indivíduos idosos (Parker *et al.*, 2000), enquanto a resposta do cortisol induzida pelo mesmo hormônio se manteve constante ou exibiu aumento.

Os níveis plasmáticos de DHEA-S em homens e mulheres adultos são de 100 a 500 vezes maiores que os níveis de testosterona e 1.000 a 10.000 vezes que aquelas de estradiol, porém fornecendo um amplo reservatório para conversão à andrógenos/estrógenos nos tecidos periféricos que possuam a maquinaria necessária para transformar o DHEA em esteróide sexual ativo (Labrie *et al.*, 2005).

Estudos frequentemente conduzidos com doses suprafisiológicas, têm levado à suposição de que o declínio do DHEA relacionado à idade pode desempenhar um papel nas mudanças degenerativas observadas em humanos idosos e que a administração de DHEA

pode reverter algumas dessas mudanças (Arlt e Hewison, 2004). Entretanto, as adrenais de roedores não são capazes de sintetizar DHEA (Miller, 2002) e assim, os níveis circulantes de DHEA e DHEA-S nesses animais está, em ordem de magnitude, diversas vezes menor que nos humanos, não havendo relatos desse padrão de declínio nas concentrações de DHEA com o envelhecimento dos roedores (Arlt e Hewison, 2004).

O decréscimo no nível sérico de DHEA está associado ao aumento na incidência de aterosclerose, obesidade e diabetes melito tipo 2 (Mazza *et al.*, 1999). Outros efeitos benéficos atribuídos ao DHEA descritos na literatura são: ação antiproliferativa e quimioprotetora (Regelson e Kalimi, 1994).

Ademais, há evidências de redução da resistência à ação da insulina, acompanhada de redução da gordura subcutânea abdominal em mulheres que usaram creme contendo DHEA por 12 meses (Diamond *et al.*, 1996) e redução da gordura subcutânea e visceral abdominal, além de aumento da resposta de secreção da insulina frente a sobrecarga de glicose e melhora da sensibilidade à insulina em homens com idade entre 65-78 anos que receberam 50 mg de DHEA por 6 meses (Villareal e Holloszy, 2004).

O tratamento com DHEA em ratos adultos normais ou obesos induz aumento da sensibilidade à insulina (Richards, Porter e Svec, 2000; Campbell *et al.*, 2004) acompanhada de aumento no grau de fosforilação das proteínas IRS 1, IRS 2, Akt e PKC atípica em fígado e músculo estriado esquelético (Campbell *et al.*, 2004) e induz modificações morfológicas importantes nas células da ilhota pancreática secretoras de insulina em animais com 12 meses de idade, exibindo aumento na massa das células- β pancreáticas e uma melhora na capacidade de secretar insulina (Medina *et al.*, 2006). No entanto, não está definido se o tratamento com DHEA é capaz de modular a via Akt/mTOR/p70S6K, envolvida na síntese protéica de músculo esquelético de ratos adultos com 12-14 meses de idade.

2 OBJETIVOS

Caracterizar a expressão de proteínas intracelulares envolvidas na síntese proteica e investigar o efeito do tratamento com DHEA, sobre essas proteínas, em músculos esqueléticos de ratos adultos com 12-14 meses de idade.

Para isso foram avaliadas:

- 1) A expressão protéica de IR- β , IGF1R, IRS 1, IRS 2, p85PI3-K, Akt 1, Akt 2, p70S6K, ERK 1 e 2, PGC-1 α e a fosforilação em fosfoserina⁴⁷³Akt e fosfothreonina⁴²¹/serina⁴²⁴p70S6K nos músculos Sóleo (com predomínio de fibras tipo 1) e extensor digital longo (EDL, com predomínio de fibras tipo 2) através do *Immunoblotting*;
- 2) A proporção dos tipos de fibras musculares e medida da área de secção transversa relativa nos mesmos músculos através da Histoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 2-3 meses e 12-14 meses de idade fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nivilab, Colombo, PR) e água *ad libitum* e permaneceram em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de 23 ± 2 °C. A Comissão de ética em experimentação animal do ICB-USP aprovou previamente os procedimentos realizados (Certificado 051/05/CEEA).

3.2 Materiais

Os reagentes e os aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), DHEA, albumina, colagenase tipo V e poli-lisina foram 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 foram fornecidos pela *Amersham (UK)*. D-glicose anidra e PEG (polietileno glicol + tampão borato) foram fornecidos pelo *Labsynth*. Os anticorpos anti-IR- β , anti-receptor de IGF 1, anti-IRS 2, anti-Akt 2, anti-fosfoserina⁴⁷³Akt, anti-p70S6K e anti-fosfothreonina⁴²¹/serina⁴²⁴ p70S6K foram da *Santa Cruz Biotechnology*; anti-IRS 1, anti-p85PI3-K, anti-Akt 1 e anti-MAPK42/44 (também denominados anti-ERK 1 e 2) foram da *Upstate Biotechnology* e anti-fosfothreonina²⁰²/tirosina²⁰⁴ MAPK foi da *Cell Signaling Technology*.

3.3 Métodos

3.3.1 Administração de DHEA

Os ratos de 12-14 meses receberam veículo (óleo de soja) contendo ou não DHEA (10 mg/kg) em injeção subcutânea, dose única, e sete dias após foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico.

3.3.2 Índice de decaimento da glicose (K_{itt})

Para avaliar a sensibilidade à insulina, os animais após privação alimentar de 10 a 12 horas, foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso do animal). Ao se confirmar o efeito do anestésico através da observação da não retirada da cauda a estímulo de pressão, foi injetada solução de insulina (750 mU/ml/kg de massa do animal) na veia porta hepática. Amostras de sangue da cauda foram coletadas em um glicosímetro (Accu-Chek Go, Roche) para dosagem da glicemia nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após injeção de insulina. A constante de decaimento da glicose (K_{itt}) foi calculada pela fórmula $0,693/t^{1/2}$, onde $t^{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear do decaimento da glicose plasmática (Bonora *et al.*, 1989, 2000).

3.3.3 Extração das proteínas totais dos músculos esqueléticos

Foram selecionados os músculos Extensor digital longo (EDL) e Sóleo em cada animal. Amostras dos tecidos extraídos foram utilizadas para extração total de proteínas. Os músculos dos grupos controle e DHEA foram homogeneizados com polytron em 2 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). Depois foram tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V) e 90 µg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida. Em cada gel há um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

3.3.4 Análise protéica por *Immunoblotting*:

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da *Bio-Rad* por 2 horas a 120 V, como descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de 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 10 mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) a 4 °C durante a noite. Seguindo as recomendações de cada fabricante quanto a diluição dos anticorpos, as membranas foram então incubadas com anticorpos específicos em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) por 8-12 horas (*overnight*) a 4 °C e lavadas com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, estas membranas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência 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).

3.3.5 Histoquímica da ATPase de Miosina

Os músculos Sóleo e EDL foram extraídos, cortados ao meio e uma das metades banhada em isopentano gelado por 10 segundos e imediatamente posta no nitrogênio líquido e estocado em temperatura -80°C . Os músculos congelados foram cortados transversalmente em $10\text{ }\mu\text{m}$ de espessura partindo da região média à região proximal usando um criostato (LEICA CM 1850). Séries alternadas de cortes transversos foram obtidos em uma região média e proximal de todos os músculos extraídos incubados para atividade da ATPase miofibrilar em lâminas para reação em solução alcalina (pH 10,3) e ácida (pH 4,3). As lâminas para solução alcalina foram incubadas por 4 minutos em 4°C em solução contendo 2 g CaCl_2 dissolvidos em 200 ml de formalina 10% [10 ml de formaldeído 100 ml de água]. Em seguida estas lâminas foram incubadas em solução alcalina [751 mg glicina, 585 mg NaCl, 860 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 100 ml de água, mais 9 ml de NaOH 1 M em 90 ml de água, pH 10,3], enquanto as lâminas para pH 4,3 foram incubadas em solução ácida [1,36 g Na-acetato em 50 ml de água; tendo 6 ml deste volume desprezado, mais 0,6 ml ácido acético glacial em 50 ml de água, completando a solução para volume final de 200 ml e acréscimo de 530 mg $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 4,3] ambas por 10 minutos. Em seguida a reação da ATPase da Miosina foi usada para identificar o tipo de fibra muscular na solução alcalina descrita acima [dissolvendo 100 mg ATP, pH 9,5 e solução filtrada para uso] por 35 minutos em 37°C . Depois as lâminas foram incubadas em solução contendo 4 g de CoCl_2 em 200 ml de água por 5 minutos. Depois foram incubadas em solução de 0,5% de sulfeto de amônio por 3 minutos, seguida de fechamento das lâminas com lamínulas em gelatina glicina [gelatina granular 10 g dissolvida em 60 ml de água $32\text{--}35^{\circ}\text{C}$ mais glicerina 50 ml e fenol 1 g]. A incidência dos tipos de fibra 1, intermediárias e 2b e a área de secção transversa foi avaliada em uma unidade de digitalização conectada a um computador captadas por meio de software Metamorph e as imagens subdivididas em campos (mapeamento). A análise foi realizada em 5 (cinco) dos campos selecionados aleatoriamente¹, onde um mínimo de 1.500 fibras foram contadas e classificadas de acordo com a atividade da ATPase.

¹ Usando tabela de números aleatórios, retirada da Tabela XXXIII de Fisher, Statistical Methods for Research Workers, publicado por Oliver e Boyd, Edinburgh, In: Tomas, JR e Nelson, JK. Métodos de pesquisa em atividade física, 3. ed., Porto Alegre: Artmed; 2002.

3.3.5.1 Área de secção transversa

Após classificação, a área de secção transversa das fibras seleccionadas foi determinada usando um microscópio de fluorescência (Olympus CK2, Japão) com ampliação da imagem em 10 vezes (10x), equipado com uma câmara de vídeo digital (Nikon DXM 1200, Japão) e um software de imagem (Image Pró-plus, Media Cybernetic).

3.3.6 Análise estatística

Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média sistematizados no programa Graph Pad Prism®. Foram utilizados 2 testes estatísticos: o teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos e posteriormente representados em porcentagens de variação em relação ao grupo de 12-14 meses, ao qual se atribuiu valor de 100% às condições em que isto se aplica e o teste de uma via (*one way*) ANOVA com pós-teste de Bonferroni em comparação entre mais de dois grupos. Foi considerado valor significativo para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos animais

As características gerais dos animais utilizados nos diferentes experimentos estão apresentadas na tabela 1. Os animais com 2-3 meses de idade compõem o grupo jovem, enquanto os animais com 12-14 meses foram divididos em grupo controle e grupo tratado com DHEA. Todas as medidas foram realizadas após privação alimentar noturna de 10 a 12 horas.

Tabela 1 – Características gerais dos animais de 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade tratados com veículo (controle) ou DHEA.

	<i>Jovem</i>	<i>12-14 meses controle</i>	<i>12-14 meses DHEA</i>
Massa corporal (MC) (g)	328 ± 8 (15)	439 ± 13 (13)*	428 ± 12 (13)*
Relação Sóleo (g)/MC (g)	0,04 ± 0,003 (15)	0,04 ± 0,001 (10)	0,03 ± 0,002 (11)
Relação EDL (g)/MC (g)	0,04 ± 0,001 (15)	0,04 ± 0,001 (8)	0,04 ± 0,001 (11)
Relação GP (g)/MC (g)	0,70 ± 0,069 (15)	1,10 ± 0,112 (11)**	1,12 ± 0,106 (11)**
K_{itt} (%·min⁻¹)	4,84 ± 1,05 (7)	2,64 ± 0,25 (9)**	2,73 ± 0,43 (11)**
Androstenediona (ng·ml⁻¹)	-	56 ± 9 (8)	72 ± 9 (8)
Testosterona (ng·ml⁻¹)	-	711 ± 211 (8)	448 ± 122 (8)
Estradiol (ng·ml⁻¹)	-	1,975 ± 0,48 (8)	1,388 ± 0,29 (8)
Progesterona (ng·ml⁻¹)	-	2,04 ± 0,83 (8)	2,77 ± 0,55 (8)

Os valores na tabela estão expressos como Média ± Erro Padrão da Média de 3 experimentos diferentes com exceção às dosagens hormonais, representados por 2 experimentos. Os valores entre parênteses representam os números de animais utilizados. MC= massa corporal expressa em gramas (g); GP= gordura perigonadal expressa em gramas (g). * $p<0,001$ e ** $p<0,05$ representam diferença entre os animais de 12-14 meses (controle e DHEA) em comparação ao grupo jovem.

A massa corporal entre os animais de 2-3 e 12-14 meses apresentou diferença significativa, sendo maior nos animais com 12-14 meses, controle e DHEA $34 \pm 4\%$ ($p<0,001$) e $30 \pm 4\%$ ($p<0,001$), respectivamente. Ademais, a relação entre as massas do músculo Sóleo e EDL pela massa corporal não foi diferente entre os grupos jovem, controle e DHEA. Entretanto, a relação entre as massas de tecido adiposo perigonadal e corporal foi maior nos grupos com 12-14 meses em comparação ao grupo jovem, $70 \pm 17\%$ ($p<0,05$) e $67 \pm 17\%$ ($p<0,05$) para controle e DHEA, respectivamente.

A comparação realizada entre o índice que mede a sensibilidade à ação da insulina, obtido pelo teste de decaimento da glicose (K_{itt}), confirma que ratos com 12-14 meses de idade são mais resistentes à insulina que os ratos com 2-3 meses de idade. No entanto, o tratamento com DHEA não modificou a sensibilidade à insulina nos ratos mais velhos.

Finalmente, quando foram comparados os níveis circulantes dos hormônios androstenediona, testosterona, estradiol e progesterona, observou-se que não houve diferença significativa para cada hormônio entre os grupos 12-14 meses controle e tratado com DHEA.

4.2 Evolução temporal (*Time course*)

A fim de determinar o tempo no qual há um grau máximo de fosforilação do receptor de insulina (pp95), pp185 (banda que contém as proteínas IRS 1 e IRS 2), Akt, p70S6K e MAPK (ou ERK 1 e 2), foram realizados experimentos em ratos de 2-3 meses de idade onde tecidos musculares, Sóleo e EDL, foram retirados do animal no estado basal (tempo 0') e 2, 3, 5, 10, 20 e 35 minutos após a injeção de insulina regular na veia porta hepática (Figura 1).

A pp95 no Sóleo tem sua fosforilação aumentada desde os 2 minutos se mantendo elevada em relação ao basal até os 35 minutos após injeção de insulina, e exibindo pico de sua fosforilação por volta dos 5 minutos. No EDL a fosforilação desta proteína também esteve aumentada entre os 2 e 35 minutos, mas apresentou pico de fosforilação mais tardio, por volta dos 10 minutos, mantendo-se por este nível até os 35 minutos.

A fosforilação da pp185 no músculo Sóleo atingiu seu pico entre os 2 e 5 minutos após estimulação com insulina, diminuindo pelos minutos seguintes mesmo mantendo a fosforilação maior até os 35 minutos quando comparada ao estado basal. No músculo EDL, entretanto, a fosforilação da pp185 parece ser semelhante entre os tempos 0 e 5 minutos, mas atinge pico entre 10 e 20 minutos após estímulo com insulina. A intensidade do sinal no Sóleo foi expressivamente maior quando comparada ao EDL.

A utilização de anticorpo anti-Akt-fosfoSerina⁴⁷³ mostrou que a infusão com insulina induziu fosforilação dessa proteína em ambos os músculos esqueléticos a partir de 2 minutos da sua infusão. Foi possível observar que até os 35 minutos da infusão com o hormônio houve manutenção da fosforilação da Akt.

Figura 1. Grau de fosforilação de proteínas nos músculos Sóleo e EDL de ratos com 2-3 meses de idade, nos diferentes tempos após infusão de insulina. As proteínas foram extraídas e processadas conforme descrição feita em Materiais e Métodos e submetidas ao *Immunoblotting* com anticorpos anti-fosfotirosina do receptor de insulina (IR), da pp185, anti-fosfoserina da Akt, anti-fosfotreonina/serina da p70S6K e anti-fosfotreonina/tirosina da p44/42 da MAPK (também conhecidas como ERK 1 e 2).

O grau de fosforilação nos resíduos Threonina⁴²¹/Serina⁴²⁴ da p70S6K no Sóleo exibiu um padrão de fosforilação cujo pico foi alcançado entre 20 e 35 minutos após injeção com insulina. No EDL, o momento em que alcança o pico de fosforilação, por volta dos 35 minutos, é semelhante ao Sóleo. No entanto, chama atenção que a magnitude do grau de fosforilação no Sóleo foi muito maior que no EDL. Por outro lado, o grau de fosforilação dos resíduos Threonina²⁰²/Tirosina²⁰⁴ da MAPK foi semelhante antes e após a infusão com insulina em ambos os músculos estudados.

4.3 Comparação dos níveis protéicos entre os músculos Sóleo e EDL

Com o propósito de comparar a concentração de proteínas envolvidas em vias específicas da sinalização da insulina relacionadas à síntese protéica entre os músculos Sóleo e EDL de animais com 12-14 meses de idade (Fig. 2), os extratos totais de cada tecido foram

Figura 2. Expressão de proteínas entre os músculos Sóleo e EDL de animais com 12-14 meses de idade. As proteínas foram extraídas e processadas conforme descrição feita em Materiais e Métodos e submetidas ao *Immunoblotting* com os anticorpos anti-PGC 1α, anti-receptor de insulina (IR-β), anti- receptor do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF1R), anti-substrato 1 do receptor de insulina (IRS 1), anti-substrato 2 do receptor de insulina (IRS 2), anti-fosfatidilinositol-3 quinase (p85PI3-K), anti-Akt 1, anti-Akt 2, anti-p70S6K, e anti-ERK 1 e 2.

submetidos à separação protéica simultaneamente em gel de poliacrilamida e sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e as proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos específicos. Dessa forma, as amostras de cada tecido puderam ser analisadas e comparadas entre si.

As expressões do receptor de insulina (IR- β) avaliada pela subunidade β transmembrana, da proteína intracelular Akt 1, da proteína mitogênica ERK 1 e da PGC 1 α foram maiores no músculo Sóleo em $77 \pm 3\%$ ($p < 0,0001$), $75 \pm 5\%$ ($p < 0,0001$), $38 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) e $68 \pm 10\%$ ($p < 0,01$), respectivamente, quando comparadas com a expressão dessas proteínas no músculo EDL. Por outro lado, as expressões do receptor do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF1R), do substrato 2 do receptor de insulina (IRS 2) e da p85PI3-K foram menores no Sóleo em $44 \pm 17\%$ ($p < 0,05$), $33 \pm 8\%$ ($p < 0,05$) e $52 \pm 8\%$ ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparadas ao EDL.

4.4 Efeito do DHEA sobre a expressão de proteínas nos músculos Sóleo e EDL

Com o propósito de avaliar o efeito da dose única de DHEA no músculo esquelético de ratos com 12-14 meses de idade, foram extraídas proteínas totais do Sóleo e EDL dos animais de cada grupo, controle e DHEA.

Como mostra a figura 3, a expressão protéica no Sóleo para os receptores de insulina (IR) (Fig. 3A) e fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF1R) (Fig. 3B) não modificou em função do tratamento com DHEA. A expressão dos substratos 1 (Fig. 3C) e 2 (Fig. 3D) do receptor de insulina e da subunidade regulatória (p85) da PI3-K (Fig. 3E) não foi diferente entre o grupo 12-14 meses controle em comparação ao grupo DHEA. As proteínas a jusante da PI3-K, a Akt 1 (Fig. 3F), Akt 2 (Fig. 3G) e p70S6K (Fig. 3I) exibiram um padrão de expressão semelhante nos animais do grupo tratado com DHEA quando comparado aos do grupo controle. Ademais, o grau de fosforilação basal e após estímulo insulínico das proteínas Akt (Fig. 3H) e p70S6K (Fig. 3J) também não sofreu modificações pelo tratamento com DHEA.

As proteínas ERK 1 e 2 (Fig. 3K), envolvidas com efeitos do crescimento e proliferação celular e a proteína PGC 1 α (Fig. 3L), envolvida com a regulação dos sinais para biogênese mitocondrial apresentaram níveis protéicos semelhantes em ambos os grupos controle e DHEA.

Figura 3. Expressão e fosforilação de proteínas no músculo Sóleo de ratos com 12-14 meses de idade com administração ou não de desidroepiandrosterona. As proteínas foram extraídas e processadas conforme a descrição em Materiais e Métodos e submetidas ao *Immunoblotting* com anticorpos: A) anti-IR- β ; B) anti-IGF1R; C) anti-IRS 1; D) anti-IRS 2; E) anti-p85PI3-K; F) anti-Akt 1; G) anti-Akt 2; H) anti-fosfo⁴⁷³ Akt; I) anti-p70S6K; J) anti-fosfothr⁴²¹/ser⁴²⁴ p70S6K; K) anti-ERK 1 e 2 e L) anti-PGC 1 α . Grupo 12-14 meses controle sem estímulo de insulina (*Barras brancas*), grupo 12-14 meses controle com estímulo de insulina (*barras linhas verticais*), grupo 12-14 meses DHEA sem estímulo com insulina (*barras pretas*), grupo 12-14 meses DHEA com estímulo de insulina (*barras linhas horizontais*). Os resultados estão representados como % média $\pm$ EPM de 3 experimentos diferentes.

No EDL, como mostra a figura 4, os padrões de expressão das proteínas analisadas foram semelhantes àqueles do Sóleo, com os receptores de insulina (Fig. 4A) e IGF 1 (Fig.

4B) apresentando níveis protéicos semelhantes no grupo DHEA em comparação ao grupo controle.

Figura 4. Expressão e fosforilação de proteínas no músculo EDL de ratos com 12-14 meses de idade com administração ou não de desidroepiandrosterona. As proteínas foram extraídas e processadas conforme a descrição em Materiais e Métodos e submetidas ao *Immunoblotting* com anticorpos: A) anti-IR-β; B) anti-IGF1R; C) anti-IRS 1; D) anti-IRS 2; E) anti-p85PI3-K; F) anti-Akt 1; G) anti-Akt 2; H) anti-fosforoser⁴⁷³ Akt; I) anti-p70S6K; J) anti-fosfoser⁴²¹/ser⁴²⁴ p70S6K; K) anti-ERK 1 e 2 e L) anti-PGC 1α. Grupo 12-14 meses controle sem estímulo de insulina (*Barras brancas*), grupo 12-14 meses controle com estímulo de insulina (*barras linhas verticais*), grupo 12-14 meses DHEA sem estímulo com insulina (*barras pretas*), grupo 12-14 meses DHEA com estímulo de insulina (*barras linhas horizontais*). Os resultados estão representados como % média ± EPM de 3 experimentos diferentes.

Não foram observadas diferenças na expressão do IRS 1 (Fig. 4C), IRS 2 (Fig. 4D) e p85PI3-K (Fig. 4E) quando comparados os níveis protéicos dos animais do grupo 12-14 meses DHEA com o grupo 12-14 meses controle. A concentração das proteínas envolvidas com sinais para síntese protéica e captação de glicose, Akt 1 (Fig. 4F), Akt 2 (Fig. 4G) e p70S6K (Fig. 4I) não apresentaram diferenças estatísticas após comparação entre os grupos controle e DHEA. De modo semelhante ao detectado no Sóleo, o grau de fosforilação basal e estimulado pela insulina no EDL para Akt (Fig. 4H) e p70S6K (Fig. 4J) não sofreu influência do tratamento com DHEA. As proteínas ERK 1 e 2 (Fig. 4K) e PGC 1 α (Fig. 4L) exibiram concentrações equivalentes nos animais do grupo DHEA em comparação aos do grupo controle.

4.5 Histoquímica da ATPase da Miosina

Por meio da atividade da ATPase da Miosina nos cortes de músculos, foi possível analisar a incidência dos tipos de fibras musculares e a área de secção transversa de cada fibra individualmente.

No músculo Sóleo foram analisadas 2.670, 1.980 e 1.681 fibras, respectivamente dos animais jovens (2-3 meses de idade), 12-14 meses controle e 12-14 meses DHEA, enquanto no músculo EDL foram analisadas 3.265, 2.632 e 2.901 fibras respectivamente naqueles grupos, obtidas de 5 campos por corte de músculo de cada animal captados em microscópio de luz.

Na figura 5, a marcação de parte das fibras do Sóleo presentes em um dos campos de um animal jovem (Fig. 5 A e B), 12-14 meses controle (Fig. 5 C e D) e 12-14 meses DHEA (Fig. 5 E e F) após reação da ATPase da Miosina em soluções com pH 4.3 (A, C e E) e 10.3 (B, D e F). Foi possível observar uma maior população de fibras tipo 1 neste músculo, dando suporte à característica metabólica predominantemente oxidativa. A proporção de fibras intermediárias e tipo 2b foram analisadas em conjunto devido ao baixo percentual dessas fibras observadas no Sóleo.

Figura 5. Corte histológico do músculo Sóleo. Imagens de fibras dos grupos jovem (*painéis A e B*), 12-14 meses controle (*painéis C e D*) e 12-14 meses DHEA (*painéis E e F*) identificando fibras tipo 1 (a), intermediárias (b) e tipo 2b (c) através de reação da ATPase da Miosina em pH 4.3 (*esquerda*) e pH 10.3 (*direita*) por captação de imagem através de microscópio de luz com *ampliação de 10x*.

Na figura 6, a marcação de parte das fibras do EDL presentes em um dos campos de

Figura 6. Corte histológico do músculo EDL. Imagens de fibras dos grupos jovem (*painéis A e B*), 12-14 meses controle (*painéis C e D*) e 12-14 meses DHEA (*painéis E e F*) identificando fibras tipo 1 (a), intermediárias (b) e tipo 2b (c) através de reação da ATPase da Miosina em pH 4.3 (*esquerda*) e pH 10.3 (*direita*) por captação de imagem através de microscópio de luz com *ampliação de 10x*.

um animal jovem (Fig. 6 A e B), 12-14 meses controle (Fig. 6 C e D) e 12-14 meses DHEA (Fig. 6 E e F) após reação da ATPase da Miosina em soluções com pH 4.3 (A, C e E) e 10.3 (B, D e F).

Na tabela 2 observa-se a distribuição percentual dos tipos de fibras analisados no Sóleo. Através destes dados é possível observar que não há diferenças significativas na proporção desses tipos de fibras nos animais com idade mais avançada em comparação às mesmas populações de fibras em animais com 2 a 3 meses de idade, e que o tratamento com dose única de DHEA nos animais com 12-14 meses não modificou este parâmetro.

Tabela 2 - Proporção dos tipos de fibra no músculo Sóleo de animais com 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade controles e tratados com DHEA.

<i>Grupo / tipo de fibra</i>	(%)	(%)
	Tipo 1	Intermediárias + tipo 2b
Jovem	84 ± 4,5	16 ± 4,5
12-14 meses controle	94 ± 6,0	6 ± 6,0
12-14 meses DHEA	97 ± 3,0	6 ± 6,0

Proporção dos tipos de fibras musculares de acordo com a coloração assumida após 35 minutos de incubação dos cortes em meio contendo ATP em temperatura de 37 °C, através da reação da ATPase da Miosina, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores estão expressos como % Média ± EPM.

Na tabela 3 observa-se a distribuição percentual dos tipos de fibras analisados no EDL. Neste tecido, a proporção de fibras tipo 2b diminui significativamente nos ratos mais velhos a valores menores que 50% em relação aos animais com 2 a 3 meses de idade, acompanhada de aumento em 28 vezes a proporção de fibras intermediárias. No entanto, o tratamento com DHEA não apresentou qualquer modificação nesta proporção de fibras.

Tabela 3 - Proporção dos tipos de fibra no músculo EDL de animais com 2-3 meses (jovem) e 12-14 meses de idade controles e tratados com DHEA.

<i>Grupo / tipo de fibra</i>	(%)	(%)	(%)
	Tipo 1	Intermediárias	Tipo 2b
Jovem	4 ± 2,0	2 ± 0,5	94 ± 2
12-14 meses controle	3 ± 0,4	56 ± 6,0*	41 ± 6*
12-14 meses DHEA	5 ± 2,5	69 ± 6,0*	26 ± 5*

Proporção dos tipos de fibras musculares de acordo com a coloração assumida após 35 minutos de incubação dos cortes em meio contendo ATP em temperatura de 37 °C, através da reação da ATPase da Miosina, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores estão expressos como % Média ± EPM. * $p < 0,001$ representa diferença entre os animais de 12-14 meses (controle e DHEA) em comparação ao grupo jovem.

A análise individual da área de secção transversa das diferentes fibras foi comparada através da média entre os três grupos. Esses valores foram corrigidos pela massa corporal de cada animal e foi denominado de média relativa da área de secção transversa. Para o músculo Sóleo, o grupo jovem exibiu média relativa da área de secção transversa para fibras do tipo 1 de $9,98 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{g}$, o grupo 12-14 meses controle de $8,1 \pm 1,1 \mu\text{m}^2/\text{g}$ e o grupo 12-14 meses DHEA apresentou média de $9,6 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{g}$ (Fig. 7A), sem que diferenças significativas fossem observadas entre os três grupos.

A média relativa da área de secção transversa do conjunto de fibras intermediárias e tipo 2b no Sóleo foram semelhantes nos 3 grupos de animais ($9,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{g}$, $7,5 \pm 1,3 \mu\text{m}^2/\text{g}$ e $8,4 \pm 1,6 \mu\text{m}^2/\text{g}$ para o grupo jovem, 12-14 meses controle e 12-14 meses DHEA, respectivamente) (Fig. 7B).

Figura 7. Média relativa ($\mu\text{m}^2/\text{g}$) da área de secção transversa dos tipos de fibras do músculo Sóleo. A identificação dos tipos de fibra ocorreu por incubação das lâminas em soluções com pH de 4.3 ou 10.3, conforme descrito em Materiais e Métodos. Estão expressas as comparações das fibras tipo 1 (gráfico A), e do conjunto de fibras intermediárias e tipo 2b (gráfico B) entre cada grupo, sendo representadas por grupo jovem/barras hachuradas, grupo 12-14 meses controle/barras brancas e grupo 12-14 meses DHEA/barras pretas. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ EPM.

No músculo EDL, que apresenta predomínio de fibras tipo 2, foi detectada redução do tamanho da área relativa com o avanço da idade para $72 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) nos animais 12-14 meses controle e $61 \pm 6\%$ ($p < 0,01$) nos animais 12-14 meses DHEA comparados aos jovens (Fig. 8A). Essa redução na média relativa da área das fibras tipo 2b foi acompanhada de aumento da média das fibras intermediárias para $257 \pm 19\%$ ($p < 0,001$) nos animais 12-14 meses controle e $217 \pm 19\%$ ($p < 0,01$) nos animais 12-14 meses DHEA em comparação à média relativa dos animais jovens (Fig. 8B). Por outro lado, as fibras tipo 1 deste músculo que

representam a menor população celular, apresentaram média relativa da área de secção transversa estatisticamente menor nos ratos com 12-14 meses tratados com DHEA (para $74 \pm 6\%$, $p < 0,05$) em comparação à média dos animais jovens (Fig. 8C).

Figura 8. Média relativa ($\mu\text{m}^2/\text{g}$) da área de secção transversa dos tipos de fibras do músculo EDL. A identificação dos tipos de fibra ocorreu por incubação das lâminas em soluções com pH de 4.3 ou 10.3, conforme descrito em Materiais e Métodos. Estão expressas as comparações entre fibras tipo 2b (gráfico A), fibras Intermediárias (gráfico B) e fibras tipo 1 (gráfico C) entre cada grupo, sendo representadas por grupo jovem/barras hachuradas, grupo 12-14 meses controle/barras brancas e grupo 12-14 meses DHEA/barras pretas. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ EPM.

5 DISCUSSÃO

As alterações que acompanham o aumento da idade afetam diversos sistemas corporais e, em particular, as mudanças que ocorrem sobre o sistema endócrino resultam tanto em declínios da responsividade dos tecidos quanto queda na secreção hormonal das glândulas periféricas (Chahal e Drake, 2007). Com o envelhecimento, aumenta-se o desenvolvimento da resistência à insulina, e esse fenômeno tem significado clínico relevante quando se considera seu risco para maioria das doenças nessa fase da vida (Abbatecola e Paolisso, 2008). Ademais, a insulina desempenha tanto um papel anabólico (Biolo *et al.*, 2003) quanto anticatabólico no sistema muscular (Fryburg *et al.*, 1992). A ação reduzida desse hormônio sobre o músculo esquelético pode contribuir com um desequilíbrio protéico que resulta na sarcopenia.

Dentre o conjunto de alterações observado nos indivíduos velhos uma característica marcante é a redução da massa muscular acompanhada de aumento da adiposidade. Ratos com 12-14 meses de idade apresentam maior adiposidade quando comparados à ratos de 2-3 meses de vida. E, esses animais com 12 meses de vida têm sido usados como modelo de obesidade e resistência à insulina e em processo de envelhecimento (Nishimura *et al.*, 1988; Kono *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2006).

No presente estudo, a relação entre a massa de tecido muscular pela corporal manteve-se semelhante entre as duas faixas de idades. Com o aumento da idade, observa-se um aumento do conteúdo de proteínas oxidáveis no interior celular, as quais não podem ser eficientemente removidas pelos sistemas proteolíticos através da ubiquitinação ou do sistema lisossomal, e um acúmulo de proteínas não funcionais podem indicar porque as mudanças nas medidas de força muscular declinam mais rapidamente com o envelhecimento que a massa desse tecido (Grune *et al.*, 2001). A redução dessa relação é mais evidente em estudos utilizando animais com idades ainda mais avançadas, tanto pela mensuração da massa muscular relativa (Chen e Alway, 2000; Barani *et al.*, 2003) quanto pela absoluta entre músculos individualmente (Kinnard *et al.*, 2005). Por outro lado, foi possível observar que ratos com 12-14 meses apresentam um importante indicador de sarcopenia ao exibir declínio no tamanho e na proporção das fibras tipo 2b no músculo composto predominantemente por este tipo de fibras, o EDL. Apesar de aspectos funcionais (força muscular) não serem analisados neste trabalho, há evidências de que as fibras tipo 2b estão intimamente relacionadas à capacidade do tecido muscular em produzir grandes níveis de força e potência

musculares (Brunner *et al.*, 2007) e já está bem estabelecido na literatura que o músculo esquelético se torna menor (Overend *et al.*, 1992), mais fraco (Cunningham *et al.*, 1987) e mais lento (Newton e Yemm, 1986) com o aumento da idade.

Ademais, foi possível observar que nos animais com 12-14 meses o tamanho e a proporção das fibras intermediárias aumentaram em comparação aos animais jovens. O músculo possui uma propriedade de plasticidade que o permite converter fibras de um tipo a outro (fibras tipo 2b ↔ fibras intermediárias ↔ fibras tipo 1) tendo sido observado em modelos experimentais através de inervação cruzada (Buller, Eccles e Eccles, 1960), estímulos elétricos (Lomo, Westgaard e Dahl, 1974) ou exercício físico (Bassel-Duby e Olson, 2006). Com a redução na área e proporção das fibras tipo 2b, concomitante ao aumento do tamanho e incidência das fibras intermediárias, é possível sugerir que essas modificações caracterizem uma conversão de fibras como consequência do envelhecimento, reforçando a indicação de sarcopenia no modelo animal de ratos com 12-14 meses de idade. Assim, é preciso considerar que na faixa de 12-14 meses de idade a relação entre a massa muscular pela massa corporal não seja um parâmetro adequado para identificar os efeitos do envelhecimento sobre o sistema muscular.

Os tipos de fibras no músculo esquelético exercem papel importante no metabolismo energético em função de sua distinta responsividade à insulina e seus efeitos oxidativos. Apesar de, durante o envelhecimento, o número de fibras mais responsivas à insulina ser preservado em detrimento das fibras menos responsivas, há aumento da resistência à insulina com redução do clearance de glicose determinado pela ação muscular (Mukasa *et al.*, 1998). O músculo Sóleo apresenta composição com predominância de fibras tipo 1 (Ariano, Armstrong e Edgerton, 1973; Suwa, Nakamura e Katsuta, 1999) que lhe confere uma maior capacidade para captação de glicose frente ao estímulo por insulina (Lillioja *et al.*, 1987; Kern *et al.*, 1990; Kriketos *et al.*, 1996; Zierath *et al.*, 1996), enquanto o músculo EDL é composto predominantemente por fibras tipo 2 (Ariano, Armstrong e Edgerton, 1973; Suwa, Nakamura e Katsuta, 1999), mas com grande capacidade para captação de glicose em resposta à contração muscular (Ploug, Galbo e Richter, 1984).

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo, estimulação *in vivo* com insulina, extração e homogenização de tecido muscular esquelético em tampões desnaturantes ou em condições apropriadas para realização do *immunoblotting* com anticorpos específicos, permitiram uma avaliação de etapas da síntese protéica e mitogênese no estado basal e após ligação da insulina ao seu receptor nos músculos Sóleo e EDL, bem

como uma análise comparativa dessas etapas entre os dois tecidos nos animais com 12-14 meses de idade.

Os mecanismos responsáveis pelas variadas respostas que os diferentes tipos de fibras musculares exibem na ação insulínica ainda não são completamente esclarecidos. Assim, procurando caracterizar a expressão e fosforilação de proteínas entre os músculos Sóleo e EDL, observou-se que no Sóleo de ratos com 12-14 meses há maior expressão do IR- β (77%) e que o pico de sua fosforilação acontece mais precocemente, por volta dos 5 minutos após estimulação por insulina, enquanto no EDL esse pico ocorreu a partir dos 10 minutos. O papel do IR no crescimento e metabolismo tecidual tornou-se evidente após estudos com supressão gênica dessa proteína. Humanos e modelos animais sem o IR nascem com fenótipo semelhante aos controles, mas não sobrevivem além dos primeiros dias pós-natais, indicando assim, papel essencial na homeostase energética e na manutenção do pH do meio interno, ainda que não seja essencial para crescimento e metabolismo durante o período fetal (Accili *et al.*, 1999; Taylor, 1999).

Em contrapartida, a expressão para o IGF1R foi maior no EDL (44%) em comparação ao Sóleo. Este receptor, assim como o IR, faz parte da família de receptores tirosina quinase os quais apresentam estruturas semelhantes, mas diferem na preferência ao ligante. A capacidade de ligação da insulina ao IGF1R é expressivamente menor que a capacidade do IGF 1 em se ligar ao IR (O'Connor *et al.*, 2008), e associada ao envelhecimento, observa-se redução dos níveis séricos do IGF 1 e de seus efeitos biológicos sobre tecidos alvo (Arlt e Hewison, 2004). Com base nesses dados, no músculo onde há predominância de fibras tipo 2, uma menor expressão para o IR- β , associada a menor afinidade da insulina ao IGF1R, somada a redução dos níveis séricos do IGF 1 com o avanço da idade, permitem sugerir que a maior vulnerabilidade aos efeitos de perda de sua massa com o envelhecimento (Grimby *et al.*, 1982; Punkt, Mehlhorn e Hilbig, 1998; Korach-Andre *et al.*, 2005) seja mediado, em parte, pela reduzida capacidade que as vias do IGF 1 e insulina, em conjunto, têm para regular seu metabolismo e balanço protéico observado aos 12-14 meses de vida.

A expressão protéica do IRS 1 foi semelhante entre os dois músculos nos animais de 12-14 meses, mas o IRS 2 está mais expresso (33%) no EDL. Através da análise para fosforilação de proteínas presentes na banda denominada pp185 nas auto-radiografias dos ratos jovens, ao exibirem intensidades de fosforilação e o tempo em que atingem seu pico distintos entre os tecidos, sugere-se que estas proteínas representam a necessidade de diferentes regulações sobre vias específicas envolvidas tanto para manutenção da massa

tecidual quanto em seu metabolismo. Estudos usando técnica de siRNA demonstraram papéis distintos para os IRSs 1 e 2 (Huang *et al.*, 2005; Taniguchi, Ueki, e Kahn, 2005), indicando que o IRS 1 parece mediar ações no crescimento e diferenciação celular, enquanto que o IRS 2 parece mediar ações sobre o metabolismo lipídico e sobre a via da MAPK (Bouzakri *et al.*, 2006).

A maior expressão (52%) da subunidade de 85kDa da PI3-K presente no músculo EDL, em parte, pode justificar sua menor responsividade à insulina. Há evidências com animais transgênicos demonstrando que um desequilíbrio entre os níveis das subunidades da PI3-K pode modificar a atividade dessa enzima estimulada pela insulina (Terauchi *et al.*, 1999; Ueki *et al.*, 2000, 2002, 2003; Mauvais-Jarvis *et al.*, 2002). Ademais, parece que normalmente a subunidade reguladora, p85, existe em excesso estequiométrico em relação à subunidade catalítica (p110), observando-se *pools* da subunidade regulatória livre e associada a subunidade catalítica no meio intracelular. Ambas as frações da p85 competiriam entre si por sítios de ligação nos IRSs (Terauchi *et al.*, 1999). Porém, é necessário um balanço entre as frações livres da p85 e o complexo p85-p110 para que haja um padrão adequado de respostas por parte da PI3-K. Modificações da expressão da p85 deslocam o balanço em favor da fração livre ou do complexo (Terauchi *et al.*, 1999; Ueki *et al.*, 2000, 2003; Mauvais-Jarvis *et al.*, 2002). Em particular, aumento da expressão dessa subunidade exerce um potente papel regulador negativo sobre a sinalização da insulina especificamente em músculo esquelético de ratos, além de induzir resistência à insulina (Barbour *et al.*, 2005).

Quando a análise foi realizada sobre as proteínas Akt 1 e 2, foi constatada maior expressão (75%) no Sóleo da Akt 1, não existindo diferenças na intensidade da fosforilação das Akts entre os dois músculos após estímulo com insulina endovenosa, embora seu pico tenha ocorrido em momento distinto em cada músculo. Considera-se que um dos papéis da Akt 1 está associado a regulação do crescimento celular (Brozinick Jr, Roberts e Dohm, 2003), após evidência da deficiência no crescimento de camundongos que sofreram deleção gênica para Akt 1 (Chen *et al.*, 2001), embora esses animais exibissem tolerância normal à glicose (Cho *et al.*, 2001a e b). Dentre as características conhecidas da Akt 1, destacam-se seus papéis em estimular proteínas envolvidas na síntese protéica (Chen *et al.*, 2001; Brozinick Jr, Roberts e Dohm, 2003), e inibir proteínas envolvidas em atividades proteolíticas e apoptóticas (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). Neste caso, a maior concentração de Akt 1 no músculo com população de fibras tipo 1 predominante, aparentemente, está associada ao

efeito mais discreto de perda da massa muscular em decorrência do envelhecimento comparado às fibras tipo 2.

Além disso, a proteína p70S6K apresenta padrão de expressão semelhante entre os dois músculos, mas exibe grande diferença na intensidade de sua fosforilação, sendo maior nas fibras tipo 1. Ela é regulada pela proteína mTOR cuja atividade é modulada por estímulos hormonais e de fatores de crescimento, tais como insulina e IGF 1, e por fatores nutricionais (Hay e Sonenberg, 2004) através da fosforilação da Akt (Peng *et al.*, 2003). A ativação da mTOR aumenta drasticamente a fosforilação da p70S6K e de outras proteínas envolvidas na regulação de fatores transcricionais (Hay e Sonenberg, 2004) e o papel da p70S6K implica no controle do crescimento celular via aumento da taxa de tradução de mRNAs (Montagne *et al.*, 1999; Radimerski *et al.*, 2002). Assim, é possível considerar que a maior capacidade de resposta ao estímulo com insulina da proteína p70S6K em músculos compostos predominantemente por fibras tipo 1, pode justificar maior preservação da massa tecidual durante a sarcopenia que se instala com o processo de envelhecimento, em comparação aos músculos compostos em sua maioria por fibras tipo 2. Apesar de exibir maior expressão para o receptor de IGF 1, do IRS 2 e da p85PI3K no presente estudo, o músculo com predominante população de fibras tipo 2, apresenta maior vulnerabilidade em sua massa tecidual à medida que aumenta a idade, estando de acordo com as observações de outros pesquisadores (Kinnard *et al.*, 2005).

Adicionalmente às observações da p70S6K, a maior expressão de ERK 1 em músculo com predomínio de fibras tipo 1 pode servir também de indicador da capacidade que o tecido têm de reverter parte dos efeitos do envelhecimento sobre essa população de tipo de fibras, visto que as proteínas ERKs 1 e 2 têm sido responsáveis pela transdução de sinais envolvidos no crescimento e sobrevivência celulares (Morrison e Davis, 2003; Kolch, 2005).

Características marcantes entre os vários tipos de fibras musculares residem nas diferentes funções contráteis, conteúdo mitocondrial e propriedades metabólicas (Berchtold, Brinkmeier e Müntener, 2000). As fibras tipo 1, que exibem maior conteúdo mitocondrial e metabolismo oxidativo como fonte primária de energia, expressam também grande conteúdo de proteínas PGC 1, principal co-ativador transcricional para biogênese mitocondrial, enquanto as fibras tipo 2, que geram ATP principalmente através da glicólise, exibem menores conteúdos desse co-ativador (Lin *et al.*, 2002). No presente estudo detectou-se que os níveis protéicos de PGC 1 α estão de acordo com dados encontrados na literatura, sendo mais expresso no músculo Sóleo, por possuir população predominante de fibras oxidativas, em

comparação ao músculo EDL composto por uma expressivamente menor população deste tipo de fibras.

Como o DHEA tem sido descrito capaz de melhorar ação insulínica (Richards, Porter e Svec, 2000; Campbell *et al.*, 2004), ter efeitos antiproliferativos e quimioprotetores (Regelson e Kalimi, 1994), além de reverter alguns parâmetros presentes em animais envelhecidos (Medina *et al.*, 2006), um passo importante neste estudo foi analisar os possíveis efeitos do DHEA sobre a regulação de proteínas envolvidas no sinal da insulina nos músculos Sóleo e EDL.

O DHEA pode servir como precursor na síntese de esteróides sexuais (Nephew *et al.*, 1998, Labrie *et al.*, 2005), porém, diferente dos outros esteróides, ainda não possui um receptor intracelular caracterizado. Há evidências da interação *in vitro* desse hormônio com receptor de andrógenos (RA) e estrógenos (RE) e *in vivo* em leveduras (Nephew *et al.*, 1998), e que em células endoteliais o DHEA exerce sua função através de uma proteína G_i acoplada a receptor de membrana plasmática (Liu e Dillon, 2002).

A conversão de esteróides sexuais em tecidos periféricos, diferente das gônadas e adrenais, resulta em efeito biológico sobre os mesmos tecidos onde estão sendo gerados, denominada ação intrácrina (Labrie, Belanger e Labrie, 1988; Labrie, 1991). O efeito intrácrino do DHEA depende da expressão de vários tipos de enzimas nesses tecidos (Labrie, 1991). Está bem estabelecido que além das gônadas e adrenais, a mucosa gástrica, a placa de crescimento tibial e o cérebro apresentam a maquinaria enzimática capaz de permitir essa ação intrácrina do DHEA. (Abbaszade *et al.*, 1997; Zwain e Yen, 1999; Ueyama *et al.*, 2002; Van Der Eerden *et al.*, 2002; Payne e Hales, 2004). Mais recentemente, apareceram as primeiras evidências de que o músculo esquelético também expressa esses elementos essenciais para o efeito intrácrino do DHEA, as enzimas esteroidogênicas, 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-dependente (Aizawa *et al.*, 2007). Esses autores observaram também que a enzima aromatase (P450arom), responsável pela formação de estradiol a partir da testosterona, era sintetizada e localizada preferencialmente no retículo endoplasmático da célula, sendo sua expressão significativamente maior em músculo com predominância de fibras tipo 1. Porém, o tratamento com DHEA pelo período de 1 semana não modificou os níveis circulantes de androstenediona, testosterona, estradiol e progesterona no presente estudo.

Em ratos com 24 a 30 semanas de idade, o tratamento com DHEA por uma semana foi capaz de reduzir a resistência à insulina, tanto avaliada por clamp hiperinsulinêmico (Mukasa *et al.*, 1998) quanto pelo índice de decaimento da glicose (Campbell *et al.*, 2004). Apesar dos ratos no presente estudo apresentarem peso intermediário entre os dois estudos citados acima, a injeção de DHEA não modificou a sensibilidade à insulina avaliada pela constante de decaimento da glicose. Assim, parece que a massa corporal total isoladamente não é um fator determinante no efeito do DHEA sobre a sensibilidade à insulina.

As análises indicaram que o DHEA não modificou a expressão de IR, IGF1R, IRS 1 e 2, p85PI3-K, Akt 1 e 2, p70S6K, ERK 1 e 2 e PGC 1 α nos músculos Sóleo e EDL de ratos com 12-14 meses de idade. Por outro lado, há evidências de que a incubação com DHEA *in vitro* em adipócitos humanos e de camundongos modificou a fosforilação, tanto basal quanto após estímulo com insulina, de proteínas das etapas iniciais do sinal insulínico resultando em maior concentração dos transportadores de glicose, os GLUTs 4, na membrana celular (Perrini *et al.*, 2004). Além disso, a incubação com elevadas concentrações de DHEA *in vitro* em células musculares de ratos exibiram um efeito modulatório direto aumentando a atividade de enzimas da via glicolítica, a hexocinase e fosfofrutocinase, e aumentando a expressão e translocação do GLUT 4, da região do citosol em direção à membrana celular e que a maior translocação dos transportadores devia-se a um maior grau de fosforilação das proteínas Akt e PKC atípicas nesse modelo (Sato *et al.*, 2008). Ademais, também foi observada melhora da fosforilação induzida por insulina de algumas proteínas envolvidas nesse sinal após tratamento com DHEA em tecido hepático e muscular esquelético de ratos com seis meses (Campbell *et al.*, 2004).

Hormônios esteróides integram o conjunto hormonal que regula o metabolismo protéico do músculo esquelético e exercem efeito sobre a produção de força e medida da área de secção transversa desse tecido (Skelton *et al.*, 1999; Sinha-Hikim *et al.*, 2002). Porém, o tratamento por uma semana com DHEA não modificou parâmetros morfológicos como a proporção dos tipos de fibra e medida da área de secção transversa das fibras no músculo Sóleo de ratos com 12-14 meses de idade. No entanto, apesar da evidente redução na proporção e tamanho das fibras tipo 2b no músculo EDL por efeito do envelhecimento, foi possível identificar um efeito negativo do DHEA sobre o tamanho médio das fibras tipo 1 nesse tecido. Considerando que esta população de fibras representa a menor fração do total de fibras no EDL, até o momento, não é possível inferir que significado fisiológico esse efeito do esteróide tem sobre o tecido muscular e na homeostase glicêmica. Além disso, para controle

da glicemia o papel do tecido muscular está relacionado não somente a sua responsividade à insulina, mas também a outras condições tais como, o exercício físico. Assim, é possível considerar que essa modificação detectada, redução do tamanho de fibras tipo 1 no EDL, pode ter um papel importante nos mecanismos fisiológicos relacionados a adaptação desse músculo com a realização de exercícios físicos, tanto em condições de envelhecimento quanto em condições consideradas normais, seja pelo aspecto metabólico na captação de glicose ou funcional na produção de força muscular, ou em outras condições de importância para o controle glicêmico.

Alguns estudos têm investigado os possíveis efeitos associados à terapia com DHEA utilizando protocolos que variaram de duas semanas a um ano de tratamento, tanto em humanos (Kawano *et al.*, 2003; Villareal e Holloszy, 2004; Baulieu *et al.*, 2000) quanto em modelos animais (Aragno *et al.*, 2006; Ishizuka *et al.*, 1999) e com doses mais elevadas (Aizawa *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2008). Apesar dos níveis circulantes do DHEA terem sido elevados durante uma semana de tratamento (Campbell *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006), é possível supor que um tempo maior de tratamento com o esteróide, ou que doses maiores às utilizadas no presente estudo possam ser capazes de modular a sinalização insulínica no músculo esquelético, além de exercer efeitos com significados mais evidentes sobre sua morfologia.

6 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados sugerem uma regulação músculo-específica nas vias intracelulares da insulina e IGF 1, evidenciada por diferenças nas expressões das proteínas IR- β , IGF1R, IRS 2, p85PI3-K, Akt 1 e ERK 1 com diferente efeito tempo-dependente ao estímulo com insulina, sendo que o músculo com predominância de fibras tipo 1 (Sóleo) mais responsivo à insulina do ponto de vista metabólico, também é na ativação desses elementos pela injeção com o hormônio. Além disso, em ratos com 12-14 meses de idade que já caracterizam um modelo de resistência à insulina e obesidade como consequência do envelhecimento, também é possível encontrar indicadores de sarcopenia através da reduzida proporção e tamanho médio das fibras tipo 2b em músculo composto predominantemente por elas, o EDL.

O tratamento por uma semana com dose única de DHEA não interferiu na massa corporal total, na relação entre massas teciduais pela corporal, na sensibilidade à ação da insulina, nas concentrações séricas dos hormônios sexuais, nos níveis protéicos de IR- β , IGF1R, IRS 1, IRS 2, p85PI3-K, Akt 1, Akt 2, p70S6K, ERK 1 e 2, PGC 1 α e nem nas fosforilações em resíduos Serina⁴⁷³ da Akt e Theonina⁴²¹/Serina⁴²⁴ da p70S6K nos músculos Sóleo e EDL, nem na morfologia medida pela proporção e média relativa da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibra no Sóleo de ratos Wistar com 12-14 meses de vida. No entanto, o esteróide foi capaz de reduzir o tamanho médio das fibras tipo 1 no EDL, sem que o significado fisiológico de tal modificação pudesse ser evidenciado, principalmente em razão da baixa proporção das fibras tipo 1 nesse músculo.

Ainda não está bem definido se o DHEA é capaz de exercer um efeito direto sobre vias de sinalização para insulina e IGF 1 no músculo esquelético ou se poderia agir indiretamente através de subprodutos gerados a partir do esteróide. É provável que alguns efeitos no músculo esquelético no processo de envelhecimento que repercutam no controle da glicemia sejam gerados em tratamentos com DHEA utilizando diferentes doses e/ou tempos de exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abbatecola AM, Paolisso G. Is there a relationship between insulin resistance and frailty syndrome? *Curr Pharm Des.* 2008; 14(4):405-10.
- Abbaszade IG, Arensburg J, Park CH, Kasa-Vubu JZ, Orly J, Payne AH. Isolation of a new mouse 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoform, 3beta-HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology.* 1997; 138(4):1392-9.
- Accili D, Nakae J, Kim JJ, Park BC, Rother KI. Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in mouse embryonic development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1999; 12(4):475-85.
- 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; 292(2):E577-84.
- Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1436(1-2):151-64.
- Aragno M, Mastrocola R, Medana C, Catalano MG, Vercellinatto I, Danni O, et al. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology.* 2006; 147(12):5967-74.
- Ariano MA, Armstrong RB, Edgerton VR. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals. *J Histochem Cytochem.* 1973; 21(1):51-5.
- Arlt W, Hewison M. Hormones and immune function: implications of aging. *Aging Cell.* 2004; 3(4):209-216.
- 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; 20(12):1822-6.
- Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades *Mol Cell Biochem.* 1998; 182(1-2):31-48.
- Balogopal 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; 273(4 Pt 1):E790-800.
- Barani AE, Durieux AC, Sabido O, Freyssenet D. Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol.* 2003; 95(5):208-98.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Barbour LA, Mizanoor Rahman S, Gurevich I, Leitner JW, Fischer SJ, Roper MD, et al. Increased P85 α is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem*. 2005; 280(45):37489-94.
- Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75:19-37.
- Basu R, Basu A, Nair KS. Muscle changes in aging. *J Nutr Health Aging*. 2002; 6(5):336-41.
- Baulieu E, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(8):4279-84.
- Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. 2000; 80(3):1215-65.
- Bernier M, Laird DM, Lane MD. Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(7):1844-8.
- 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; 4(3):421-32.
- Biolo G, Antonione R, Barazzoni R, Zanetti M, Guarnieri G. Mechanisms of altered protein turnover in chronic diseases: a review of human kinetic studies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003; 6(1):55-63.
- 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; 23(1):57-63.
- 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; 68(2):374-8.
- 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; 294(5547):1704-8.
- Bouzakri K, Zachrisson A, Al-Khalili L, Zhang BB, Koistinen HA, Krook A, et al. siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab*. 2006; 4(1):89-96.
- Brozinick Jr JT, Roberts BR, Dohm GL. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes*. 2003; 52(4):935-941.

- Brunner F, Schmid A, Sheikhzadeh A, Nordin M, Yoon J, Frankel V. Effects of aging on Type II muscle fibers: a systematic review of the literature. *J Aging Phys Act.* 2007; 15(3):336-48.
- Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J Physiol.* 1960; 150:399-416.
- Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995; 376(6541):599-602.
- 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 USA.* 1998; 95(4):1432-7.
- Butler P, Kryshak E, Rizza R. Mechanism of growth hormone-induced postprandial carbohydrate intolerance in humans. *Am J Physiol.* 1991; 260(4 Pt 1):E513-20.
- Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem.* 1998; 273(13):7201-04.
- Campbell CS, 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; 76(1):57-70.
- Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Ribeiro LM, Medina MC, Souza LC, et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. *Endocrine.* 2006; 29(3):391-8.
- Carvalho CR, Maeda L, Brenelli SL, Saad MJ. Tissue-specific regulation of IRS-2/PI 3-kinase association in aged rats. *Biol Chem.* 2000; 381(1):75-8.
- Carvalho CR, Brenelli SL, Silva AC, Nunes AL, Velloso LA, Saad MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology.* 1996; 137(1):151-9.
- Chahal HS, Drake WM. The endocrine system and ageing *J Pathol.* 2007; 211(2):173-80.
- Cheatham B e Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev.* 1995; 16(2):117-42.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(7):4902-11.
- Chen KD, Always SE. A physiological level of clenbuterol does not prevent atrophy or loss of force in skeletal muscle of old rats. *J Appl Physiol.* 2000; 89(2):606-12.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 2001; 15(17):2203-8.

- Cho H, Mu J, Kim J, Thorvaldsen J, Chu Q, Crenshaw EB III, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science*. 2001a; 292(5522):1728–31.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ: Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*. 2001b; 276(42):38348-52.
- Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J*. 1994; 300(Pt 3):631-5.
- Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*. 1998; 335(Pt 1):1-13.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378(6559):785-9.
- Cunningham DA, Morrison D, Rice CL, Cooke C. Ageing and isokinetic plantar flexion. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1987; 56(1):24-9.
- Cutler GB Jr, Glenn M, Bush M, Hodgen GD, Graham CE, Loriaux DL. Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*. 1978; 103(6):2112-8.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999; 13(22):2905-27.
- Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Bélanger A, Labrie F. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol*. 1996; 150(Suppl):S43-50.
- Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*. 2004; 113(1):115-23.
- Evans W. Functional and metabolic consequences of sarcopenia *J Nutr*. 1997; 127(5 Suppl): 998S-1003S.
- Evans WJ. What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50(Spec):5-8.
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 2004; 23(18):3151-71.
- Firth R, Bell P, Marsh H, Hansen I, Rizza R. Postprandial hyperglycemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of hepatic and extrahepatic tissues. *J Clin Invest*. 1986; 77(5):1525-32.

- Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem*. 1992; 267(31):22171-7.
- Forbes GB. Longitudinal changes in adult fat-free mass: Influence of body weight. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70(6):1025-31.
- Fryburg DA, Louard RJ, Gerow KE, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin's antiproteolytic action in humans. *Diabetes*. 1992; 41(4):424-9.
- Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder 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; 50(6):1324-9.
- Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(10):1974-84.
- Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003; 9(8):344-50.
- 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 USA*. 2001; 98(25):14440-5.
- Goodman MN, Druz SM, McElaney MA, Belur E, Ruderman NB. Glucose uptake and insulin sensitivity in rat muscle: changes during 3-96 weeks of age. *Am J Physiol*. 1983; 244(1):E93-100.
- Greenlund LJ, Nair KS. Sarcopenia - Consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124(3):287-99.
- Grimby G, Danneskiold-Samsoe 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; 115(1):125-34.
- Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001; 56(11):B459-67.
- Gulve EA, Henriksen EJ, Rodnick KJ, Youn JH, Holloszy JO. Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1- to 25-mo-old rats. *Am J Physiol*. 1993; 264(3 Pt 1):E319-27.
- 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; 272(42):26457-63.
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004; 18(16):1926-45.

- Hirsch E, Costa C, Ciruolo E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol*. 2007; 194(2):243-56.
- Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in L6 myotubes. *J Biol Chem*. 2005; 280(19):19426-35.
- Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J*. 1997; 16(18):5572-81.
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994; 372(6508):746-54.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(9):648-57.
- Ishizuka T, Kajita K, Miura A, Ishizawa M, Kanoh Y, Itaya S, et al. DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol*. 1999; 276(1 Pt 1):E196-204.
- Jackson R, Roshania R, Hawa M, Sim B, DiSilvio L. Impact of glucose ingestion on hepatic and peripheral glucose metabolism in man: an analysis based on simultaneous use of the forearm and double isotope techniques. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 63(3):541-9.
- Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med*. 1985; 36:429-51.
- Kamei Y, Miura S, Suzuk M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, et al. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*. 2004; 279(39):41114-23.
- Kamel HK. Sarcopenia and aging. *Nutr Rev*. 2003; 61(5 pt 1):157-67.
- Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006; 33(2):155-165.
- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*. 1982; 215(4529):185-7.
- Kawano H, Yasue H, Kitagawa A, Hirai N, Yoshida T, Soejima H, et al. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(7):3190-5.
- Kelley D, Mogan M, Veneman T. Impaired postprandial glucose utilization in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1994; 43(12):1549-57.
- Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, et al. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest*. 1988; 81(5):1563-71.

- 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; 270(2):397-400.
- Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with combined mutations of Insulin Receptor, IRS-1 and IRS-2. *J Clin Invest*. 2000; 105(2):199-205.
- Kinnard RS, Mylabathula DB, Uddemarri S, Rice KM, Wright GL, Blough ER. Regulation of p70S6k, GSK-3b, and calcineurin in rat striated muscle during aging. *Biogerontology*. 2005; 6(3):173-184.
- Kirkendall DT, Garrett WE Jr. The effects of aging and training on skeletal muscle. *Am J Sports Med*. 1998; 26(4):598-602.
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(9):6286-96.
- Knutti D, Kressler D, Kralli A. Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(17):9713-8.
- Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signaling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(11):827-37.
- Kono S, Kuzuya H, Okamoto M, Nishimura H, Kosaki A, Kakehi T, et al. Changes in insulin receptor kinase with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*. 1990; 259(1 Pt 1):E27-35.
- Korach-Andre 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. *Metabolism*. 2005; 54(4):522-28.
- Kotani K, Carozzi AJ, Sakaue H, Hara K, Robinson LJ, Clark SF, et al. Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 209(1):343-8.
- Kriketos AD, Pan DA, Lillioja S, Cooney GJ, Baur LA, Milner MR, et al. Interrelationships between muscle morphology, insulin action, and adiposity. *Am J Physiol*. 1996; 270(6 Pt 2):R1332-9.
- Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Brüning JC, Flier SN, Hanahan D, et al. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured b-cell lines. *J Clin Invest*. 1999; 104(12):R69-75.
- Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, et al. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrin*. 2005; 187(2):169-196.

Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrin Metab*. 1997; 82(8):2396-2402.

Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol*. 1991; 78(3):C113-8.

Labrie C, Belanger A, Labrie F. Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology*. 1988; 123(3):1412-7.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-85.

LaMarco K, Thompson CC, Byers BP, Walton EM, McKnight SL. Identification of Ets- and notch-related subunits in GA binding protein. *Science*. 1991; 253(5021):789-92.

Laughlin GA, Barrett-Connor E. Sexual dimorphism in the influence of advanced aging on adrenal hormone levels: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrin Metab* 2000; 85(10):3561-8.

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; 80(2):415- 424.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002; 418(6899):797-801.

Liu CH, Laughlin GA, Fischer UG, Yen SS. Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women: evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990; 71(4):900-06.

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; 277(24):21379-88.

Lomo T, Westgaard RH, Dahl HA. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1974; 187(1086):99-103.

Mader A. A transcription-translation activation feedback circuit as a function of protein degradation, with the quality of protein mass adaptation related to the average functional load. *J Theoret Biol*. 1988; 134(2):135-57.

Marcell TJ. Sarcopenia: Causes, consequences, and preventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58(10):M911-6.

Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle*. 2003; 2(3):220-3.

Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, et al. Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest*. 2002; 109(1):141-9.

- Mazza E, Maccario M, Ramunni J, Gauna C, Bertagna A, Barberis AM, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate levels in women. Relationships with age, body mass index and insulin levels. *J Endocrinol Invest*. 1999; 22(9):681-87.
- McMahon M, Marsh H, Rizza R. Comparison of the pattern of postprandial carbohydrate metabolism after ingestion of a glucose drink or a mixed meal. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 68(3):647-53.
- Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Anhê GF, Amanso AM, Teixeira VP, et al. Dehydroepiandrosterone increases beta-cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Lett*. 2006; 580(1):285-90.
- Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE. Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282(2):E419-27.
- Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 198(1-2):7-14.
- Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:91-118.
- Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 1992; 326(1):22-9.
- Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. Drosophila S6 kinase: A regulator of cell size. *Science*. 1999; 285(5436):2126-9.
- Mukasa K, Kaneshiro M, Aoki K, Okamura J, Saito T, Satoh S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) Ameliorates the Insulin Sensitivity in Older Rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998; 67(4):355-8.
- Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, Testa JR. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 88(1-2):38-40.
- Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, et al. DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N Engl J Med*. 2006; 355(16):1647-59.
- Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*. 1999; 344(Pt. 2):427-431.
- Nephew KP, Sheeler CQ, Dudley MD, Gordon S, Nayfield SG, Khan SA. Studies of dehydroepiandrosterone (DHEA) with the human estrogen receptor in yeast. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 143(1-2):133-42.

Newton JP, Yemm R. Changes in the contractile properties of the human first dorsal interosseous muscle with age. *Gerontology*. 1986; 32(2):98-104.

Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, et al. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol*. 1988; 254(1):E92-8.

O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: At the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol*. 2008; 252(1-2):91-110.

Overend TJ, Cunningham DA, Kramer JF, Lefcoe MS, Paterson DH. Knee extensor and knee flexor strength: cross-sectional area ratios in young and elderly men. *J Gerontol*. 1992; 47(6):M204-10.

Parker CR Jr, Slayden SM, Azziz R, Crabbe SL, Hines GA, Boots LR, et al. Effects of aging on adrenal function in the human: responsiveness and sensitivity of adrenal androgens and cortisol to adrenocorticotropin in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(1):48-54.

Parker CR Jr, Mixon RL, Brissie RM, Grizzle WE. Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(11):3898-901.

Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*. 2004; 25(6):947-70.

Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev*. 2003; 17(11):1352-65.

Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Belsanti G, Montrone C, Cignarelli A, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes*. 2004; 53(1):41-52.

Piers LS, Soares MJ, McCormack LM, O'Dea K. Is there evidence for an age-related reduction in metabolic rate? *J Appl Physiol*. 1998; 85(6):2196-204.

Ploug T, Galbo H, Richter EA: Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am J Physiol*. 1984; 247(6 Pt 1):E726-31.

Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans*. 2006; 34(Pt 2):213-6.

Proud CG. mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(2):429-36.

Punkt K, Mehlhorn H, Hilbig H. Region- and age-dependent variations of muscle fibre properties. *Acta Histochem*. 1998; 100(1):37-58.

Radimerski T, Montagne J, Rintelen F, Stocker H, Van der Kaay J, Downes CP, et al. dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(3):251-5.

Rahn T, Ridderstråle M, Tornqvist H, Manganiello V, Fredrikson G, Belfrage P, et al. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin induced activation and phosphorylation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. *FEBS Lett.* 1994; 350(2-3):314-18.

Rainey WE, Carr BR, Sasano H, Suzuki T, Mason JJ. Dissecting human adrenal androgen production. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13(6):234-9.

Regelson W, Kalimi M. Dehydroepiandrosterone (DHEA) - the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. Mechanism of action? *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 719:564-75.

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; 223(3):258-62.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI3K/Akt/mTOR and PI3K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001; 3(11):1009-13.

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 USA.* 1996; 93(26):15364-9.

Roubenoff R, Hughes VA. Sarcopenia: Current concepts. *J Gerontol Med Sci.* 2000; 55(12):M716-24.

Ryan AL. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med.* 2000; 30(5):327-46.

Sakaue H, Hara K, Noguchi T, Matozaki T, Kotani K, Ogawa W, et al. Ras independent and wortmannin sensitive activation of glycogen synthase by insulin in CHO cells. *J Biol Chem.* 1995; 270(19):11304-9.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004; 117(3):399-412.

Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(5):E961-8.

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(13):7772-7.

Scott PH, Lawrence JC Jr. Attenuation of mammalian target of rapamycin activity by increased cAMP in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273(51):34496-501.

Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand*. 2005; 183(1):3-12.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: Evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p-70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J*. 1995; 305(Pt 1):25-8.

Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283(1):E154-64.

Skelton DA, Phillips SK, Bruce SA, Naylor CH, Woledge RC. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin Sci (Lond)*. 1999; 96(4):357-64.

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; 46(1):23-7.

Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1179(1):27-75.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro FJ, Timofeyva 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; 14(3):395-403.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*. 1995; 377(6545):173-7.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 1991; 352(6330):73-77.

Suwa M, Nakamura T, Katsuta S. Muscle fibre number is a possible determinant of muscle fibre composition in rats. *Acta Physiol Scand*. 1999; 167(3):267-72.

Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*. 2005; 115(3):718-27.

Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell*. 1999; 97(1):9-12.

Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signalling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(21):13571-6.

- Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, et al. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet.* 1999; 21(2):230-5.
- Tomas JR, Nelson JK. Métodos de pesquisa em atividade física. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology.* 1979; 24:145-9.
- Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME. The many forks in FOXO's road. *Sci STKE.* 2003; 2003(172):RE5.
- Tsakiridis T, McDowell HE, Walker T, Downes CP, Hundal HS, Vranic M, et al. Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 1995; 136(10):4315-22.
- Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, et al. Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278(48):48453-66.
- Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(3):965-77.
- Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn CR. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(21):8035-46.
- Ueyama T, Shirasawa N, Numazawa M, Yamada K, Shelangouski M, Ito T, et al. Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis. *Endocrinology.* 2002; 143(8):3162-70.
- Van Der Eerden BC, Van De Ven J, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology.* 2002; 143(10):4048-55.
- Vanhaesebroeck B, Leivers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22(7):267-72.
- Villareal DT, Holloszy JO. Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 292(18):2243-8.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(7):489-501.
- Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR. Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA.* 2001; 286(10):1206-12.

Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol.* 2002; 27(1):19-41.

Widegren U, Ryder JW, Zierath JR. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction in skeletal muscle: Effects of exercise and muscle contraction. *Acta Physiol Scand.* 2001; 172(3):227-38.

Wijkander J, Rahn-Landstrom T, Manganiello V, Belfrage P, Degerman E. Insulin induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3b in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not MAP kinase or p70 S6 kinase. *Endocrinology.* 1998; 139(1):219-227.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1998; 391(6670):900-4.

Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard WE, Klip A, Wallberg HH: Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1996; 39(10):1180-9.

Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 1999; 140(8):3843-52.