UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ALAN FAPPI

Efeitos de diferentes glicocorticoides sobre as vias moleculares de regulação do trofismo muscular em ratos e o efeito do EPA/DHA na atrofia muscular induzida pela dexametasona

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Neurologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

ALAN FAPPI

Efeitos de diferentes glicocorticoides sobre as vias moleculares de regulação do trofismo muscular em ratos e o efeito do EPA/DHA na atrofia muscular induzida pela dexametasona

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Neurologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP).

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fappi, Alan

Efeitos de diferentes glicocorticoides sobre as
vias moleculares de regulação do trofismo muscular
em ratos e o efeito do EPA/DHA na atrofia muscular
induzida pela dexametasona / Alan Fappi. -- São
Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Descritores: 1.Atrofia muscular 2.Ácidos graxos
ômega-3 3.Glucocorticoides 4.Metilprednisolona
5.Dexametasona 6.Deflazacorte 7.Autofagia 8.Fator
de crescimento insulín-like 9.Miostatina
10.Quinases de proteína quinase ativadas por mitógeno

USP/FM/DBD-082/18

Dedicatória

Dedico essa tese a todos os colegas de trabalho que me acompanham por anos enquanto estive na bancada, desde àqueles com os serviços mais simples, auxiliares, técnicos, faxineiros, suprimindo e possibilitando o desenvolvimento da pesquisa em ambiente agradável, funcional e em tempo hábil, àqueles que estiveram comigo lado-a-lado, auxiliando braçalmente no planejamento, execução, correção e nas novas tentativas de execução, os famosos “próximos passos”, dos métodos de pesquisa até a coleta e, por vezes, análise dos dados.

Dedico esta tese especialmente aos meus pais, pois fizeram grande suporte sobre meus 4 anos de Doutorado, considerando que 50% das minhas 24hs eu passava em pesquisa os demais 50% do tempo eu passava com eles e me preparava para continuar sempre, agradeço o apoio e sei que posso continuar contando com isso por quantos anos mais for necessário, amo vocês Elói e Helena Fappi.

Dedico também essa tese aos meus irmãos (Tiago e Bárbara), minha avó (Lourdes) e os demais familiares (de ambas as partes) porquê sei o quanto acreditaram em mim e nos meus sonhos acadêmicos, ao menos em algum momento notaram que realmente eu não estava apenas discursando, passando a notar minha dedicação à pesquisa, muito obrigado pelo voto de confiança.

Por fim, quero dedicar essa tese e agradecer o apoio de meus grandes amigos: Leandro Nunes Sanches “TenCelSanches”, Chrystian J. Alves., Juliana Carvalho Neves, Dr^a Jéssica R. Maximino, Camila Vega, João Ap. S. Junior e família, Thaisa Benatti, Kathe Cocuzzi, Monique C.C., Luana Bacelar, Karine A. Kawasaki, Marina D. Tanaka, Rubens de L. Neto, Iolanda Oruê, Gilmar Marques da Silva, Thereza Florence Dinucci e Joyce Meire Giglio. Aproveito para agradecer e dedicar essa tese a todos os alunos de iniciação científica que pude compartilhar e trocar experiências e conhecimentos, vocês fizeram parte disso: Karine, Luana, Pedro, Guilherme, Thayane e Felipe.

Agradecimentos

Agradeço imensamente à Fapesp (processo 2013/23191-6) pelo suporte financeiro dado a mim desde o mestrado e durante o desenvolvimento de meu Doutorado acadêmico. Da mesma forma agradeço à Capes pelo suporte, mesmo que em curto período, sem o suporte de ambos seria inviável a realização dessa pesquisa com a dedicação qual me dispus desde o princípio. Muito obrigado!

Por fim agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Edmar Zanoteli, pelo suporte na pesquisa científica, conselhos, pela confiança em minha atuação nos demais projetos, pelos ensinamentos e auxílio no planejamento de pesquisa, compras inúmeras e pelos inúmeros pedidos de bolsa e reconsideração que fizemos juntos para auxílio dos demais alunos. Muito obrigado por tudo Professor!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. O tecido muscular esquelético.....	3
2.2. Miogênese e fatores de transcrição muscular.....	5
2.3. Atrofia muscular esquelética.....	6
2.3.1. Sistema da ubiquitina-proteasomo (SUP)	7
2.3.2. Atrofia relacionada à via do IGF-1/PI -3K/Akt/mTOR	9
2.3.3. Via de sinalização MEK/ERK na atrofia muscular.....	12
2.3.4. Via Miostatina/smad2/3 na atrofia muscular	13
2.4. Glicocorticoides e a atrofia muscular esquelética	14
2.4.1. Classificação e fisiologia.....	14
2.4.2. Mecanismo de ação celular	15
2.4.3. Reações adversas.....	16
2.4.4. Características da atrofia muscular induzida pelos glicocorticoides.....	17
2.4.5. Alvos potenciais no tratamento da atrofia muscular induzida por glicocorticoides	19
2.5. Ácidos graxos poli-insaturados e sua atuação na atrofia muscular.....	20
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivos gerais.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Animais do estudo e Estruturação	29
4.2. Suplementação com o Ômega-3 e associação com a dexametasona	29
4.4. Coleta dos materiais	32
4.5. Reações histológicas	32
4.5.1. Coloração metacromática de ATPase	32

4.5.2.	Imuno-histoquímica e imunofluorescência	33
4.6.	Eletroforese SDS-PAGE (<i>Western blotting</i>)	34
4.7.	Reação de transcriptase reversa.....	35
4.8.	PCR em tempo real	36
4.9.	Cromatografia gasosa.....	37
4.10.	Análise estatística.....	38
5.	RESULTADOS	39
SESSÃO 1: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO ÔMEGA-3 COM A DEXAMETASONA		
39		
5.1.	Massa corporal	39
5.2.	Peso da glândula adrenal	40
5.3.	Peso muscular.....	41
5.4.	Cálculo da área de secção transversa das fibras musculares	42
5.7.	Imunofluorescência de P-GR (Ser211)	46
5.8.	Análise quantitativa do GR	48
5.9.	Western blotting	48
5.9.1.	Via IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR	48
5.9.2.	PPARGR-1alfa (PGC1 α)	51
5.9.3.	Via Ras/Raf/MEK/ERK	54
5.9.4.	Via Miostatina/Smad2/3.....	55
5.10.	Análise de perfil de ácidos graxos.....	57
5.11.	Avaliação autofágica/lisossomal	58
5.12.	PCR em tempo Real.	60
5.12.1.	Atrogenes	60
SESSÃO 2: COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE DIFERENTES GLICOCORTICOIDES		
EM DOSES EQUIPOTENTES SOBRE O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO		
65		
5.13.	Massa corporal	65
5.14.	Peso Muscular	67
5.15.	Peso da glândula adrenal	67
5.16.	Área de secção transversa da fibra muscular	68
5.18.	<i>Western Blotting</i>	72
5.18.1.	Via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR	72
5.18.2.	Via Ras/Raf/MEK/ERK	74
5.18.3.	Via Miostatina/Smad2/3.....	75

5.19. PCR em tempo real	77
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES.....	104
8. REFERÊNCIAS	106
9. ANEXOS.....	129
ANEXO 1 - Laudo de análise de conteúdo da cápsula fornecida aos animais.	129

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1	do inglês, <i>factor 4E binding protein 1</i>
AIDS	do inglês, <i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
Akt/PKB	do inglês, <i>protein kinase-B</i>
DHA	do inglês, <i>docosahexaenoic acid</i>
DMC	distrofia muscular congênita
eIF-2B	do inglês, <i>eukaryotic initiation factor 2</i>
EPA	do inglês, <i>eicosapentaenoic acid</i>
FoxO	do inglês, <i>forkhead box O</i>
GA	músculo gastrocnêmio
GAD	glicoproteínas associadas à distrofina
GAPDH	do inglês, <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GSK-3 β	do inglês, <i>glycogen synthase kinase-3</i>
HMB	do inglês, <i>hydroxymethylbutyrate</i>
IGF-1	do inglês, <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IKB	do inglês, <i>IkappaB</i>
IKK	do inglês, <i>IkappaB kinase</i>
LDL	do inglês, <i>low-density lipoprotein</i>
IRS-1 e 2	do inglês, <i>insulin receptor substrate 1 e 2</i>
MAFbx	do inglês, <i>muscle atrophy f-box</i> , sinônimo para atrogina-1
MRF	do inglês, <i>myogenic regulatory factors</i>
mTOR	do inglês, <i>mammalian target of rapamycin</i>
MURF-1	do inglês, <i>muscle ring finger 1</i>
Myf5	do inglês, <i>myogenic factor 5</i>
MyHC	do inglês, <i>myosin heavy chain</i>
MyoD	do inglês, <i>myogenic differentiation</i>
mRNA	RNA mensageiro
N-3	Ômega-3
NF- κ B	do inglês, <i>nuclear factor-kappaB</i>
P70S6K	do inglês, <i>p70 ribosomal S6 Kinase</i>
PGC1 α	do inglês, <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator alpha</i>
PI-3k	do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PPAR γ	do inglês, <i>peroxisome proliferatoractivated receptor γ</i>
REDD1 e 2	do inglês, <i>Regulated in development and DNA damage responses 1 e 2</i>
SUP	sistema da ubiquitina-proteasomo
TA	tibial anterior
TGF- β	do inglês, <i>Transforming and Growth Factor-β</i>
TNF- α	do inglês, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sarcômero e sua estrutura.....	4
Figura 2: Propriedades contráteis dos diferentes tipos de fibras musculares.	5
Figura 3: Resposta das vias PI-3k e MEK/ERK durante atrofia por glicocorticoides.	13
Figura 4: Sinalização envolvida na atrofia muscular por glicocorticoides.....	19
Figura 5. Estrutura do ácido palmítico (C16:0).....	21
Figura 6. Estrutura do ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3).	21
Figura 7. Metabolismo de PUFA's e vias de metabolismo.	23
Figura 8: Esquema representativo do desenho experimental realizado.	31
Figura 9. Membranas de <i>Western blotting</i> corada para controle de proteína total.....	35
Figura 10. Variação de massa corporal durante os 40 dias de experimentação.	39
Figura 11. Peso da glândula adrenal de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.....	41
Figura 12. Peso dos músculos gastrocnêmio e tibial anterior recebendo N-3 e/ou DEXA.	41
Figura 13. Área de secção transversa muscular de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	42
Figura 14. Coloração metacromática de ATPase de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.....	43
Figura 15. Proporção de fibras musculares 1, 2A e 2B de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	44
Figura 16: Expressão de receptor total de glicocorticoide de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.....	45
Figura 17: Marcação de receptor de glicocorticoide de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.....	46
Figura 18. Imunofluorescência para marcação do receptor de glicocorticoide fosforilado.	47
Figura 19: Expressão de receptor de glicocorticoide total (tGR) e fosforilado (P-GR – Ser211).....	48
Figura 20. Expressão de AKT e GSK3 β total e fosforilada de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.....	49
Figura 21. Expressão de FoxO3a total e fosforilado de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	50
Figura 22. Expressão de PGC1 α no músculo TA de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	51
Figura 23. mATPase e imuno-histoquímica de PGC1 α	52
Figura 24. Expressão por imuno-histoquímica de PGC1 α de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	53
Figura 25. Expressão de ERK nas formas fosforilada e total de animais recebendo N-3 e/ou DEXA. ..	55
Figura 26. Expressão proteica de Smad2/3 e P-Smad2/3 de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	56
Figura 27. Avaliação do perfil de ácidos graxos no músculo GA.....	57
Figura 28. Expressão de LC3I e II de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	59
Figura 29. Expressão de P62 de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	60
Figura 30. Expressão de mRNA por PCR de atrogenes de animais recebendo N-3 e/ou DEXA.	62
Figura 31. Expressão de mRNA de fatores de transcrição e receptores.....	64
Figura 32. Massa corporal após administração de diferentes glicocorticoides.....	65
Figura 33. Peso de GA e TA após administração de diferentes glicocorticoides.	67

Figura 34. Peso da glândula adrenal após administração de diferentes glicocorticoides.	68
Figura 35. Área de secção transversa após administração de diferentes glicocorticoides.....	69
Figura 36. mATPase do músculo TA após administração de diferentes glicocorticoides.	70
Figura 37. Proporção de fibras musculares após administração de diferentes glicocorticoides.....	71
Figura 38. Expressão de AKT e GSK3 β após administração de diferentes glicocorticoides.	73
Figura 39. Expressão de FOXO3a após administração de diferentes glicocorticoides.....	74
Figura 40. Expressão de ERK1/2 após administração de diferentes glicocorticoides.....	75
Figura 41. Expressão de Smad2/3 após administração de diferentes glicocorticoides.	76
Figura 42. Expressão de mRNA de atrogenes após administração de diferentes glicocorticoides.	78
Figura 43: Expressão de mRNA de receptores após administração de diferentes glicocorticoides.....	80

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Recomendação para consumo diário de $n-3$	24
Tabela 2. Anticorpos utilizados no estudo.	35
Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos usados no estudo.....	37
Tabela 4. Média de massa corporal no decorrer do estudo.	40
Tabela 5. Contagem de proporção de fibra 1, 2A e 2B na associação N3/DEXA.	44
Tabela 6. Massa corporal no decorrer do estudo.....	66
Tabela 7. Contagem de proporção de fibra 1, 2A e 2B entre glicocorticoides.....	72

RESUMO

Fappi A. *Efeitos de diferentes glicocorticoides sobre as vias moleculares de regulação do trofismo muscular em ratos e o efeito do EPA/DHA na atrofia muscular induzida pela dexametasona* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Várias condições podem estar relacionadas com a atrofia muscular, tais como inatividade, envelhecimento, septicemia, diabetes, câncer e uso de glicocorticoides. Em tentativa prévia de prevenir tal condição catabólica secundário ao uso de glicocorticoide, através da suplementação de ômega-3 (N-3), observamos um agravamento da atrofia muscular, afetando mais tipos de fibras musculares, usualmente poupadas pelo glicocorticoide, fibras tipo 1 por exemplo. Entretanto, não foi possível determinar quais as propriedades dessa interação. Portanto, o objetivo deste estudo foi de avaliar a ação do Ômega-3 associada a dexametasona e de diferentes glicocorticoides em dose equipotente sobre o peso corporal; área de secção transversa muscular; perfil de ácidos graxos; expressão gênica de fatores de transcrição musculares e atrogenes (*Atrogina 1* e *MuRF-1*); expressão proteica de componentes das vias do IGF-1/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK e Miostatina/Smad2/3; e expressão de receptores de glicocorticoides na musculatura esquelética de ratos. **Metodologia:** Ratos Wistar suplementados ou não com ômega-3 (100mg/kg/dia de EPA) por 40 dias receberam dexametasona (DX) subcutânea (2,5 e 1,25mg/kg/dia) nos últimos 10 dias de suplementação. Para estudo dos demais glicocorticoides, ratos sem suplementação receberam deflazacorte (DC), metilprednisolona (MP) em dose/volume equipotente ao de dexametasona (DC 10 e 20mg/kg/dia e MP6,7 e 13,3mg/kg/dia) por 10 dias. Constituindo 10 grupos: CT, N-3, DX1,25, DX2,5, DX1,25+N-3, DX2,5+N-3, MP6, MP13, DC10 e DC20. Através de estudo histológico, imuno-histoquímico, PCR em tempo real e *Western blotting*, foram avaliados a área transversa dos diferentes tipos de fibras musculares; a expressão de receptor de glicocorticoide na fibra muscular; a expressão gênica dos atrogenes e fatores de transcrição; expressão de proteínas das vias IGF-1, Miostatina e MEK/ERK. **Resultados:** A administração de N-3 influenciou a atrofia por DX causando maior atrofia em fibras do tipo 1 e 2A, aumento na expressão proteica de FoxO3a total, P-Smad3, LC3-II e gênica (mRNA) de *REDD-1*, *Atrogina-1/MAFbx*. De forma isolada o ômega-3 reduziu a expressão de P-FoxO3a, PGC1 α , a quantidade de ácido araquidônico e a expressão de mRNA do *IRS-1* com aumento na expressão de LC3-II. A comparação entre glicocorticoides mostrou que a MP (13mg/kg/dia) acarretou maior impacto no peso corporal e muscular; o DC (10mg/kg/dia) causou menor atrofia em fibras 2B em relação aos demais glicocorticoides. A DX causou maior impacto sobre o Akt total em comparação com os demais glicocorticoides, em P-Akt o grupo DX1,25 teve menor expressão em relação a outros glicocorticoides em dose equipotente. Todos os glicocorticoides afetaram a expressão de P-FOXO3a. Na expressão de ERK1/2 e P-ERK1/2, MP6 foi o grupo com maior prejuízo à fosforilação em relação aos demais em dose equipotente. Já na avaliação da via Miostatina/Smad2/3 os grupos MP 6, MP13 e DC20 mostraram maior expressão de Smad2/3 total e P-Smad3. A expressão gênica de *REDD-1* e *MYOD* foi aumentada nos grupos MP6 e MP13 em relação aos demais grupos; *REDD2* no grupo DC20 foi menor em relação ao grupo DX2,5. A expressão de *Miostatina* foi menor nos grupos DX2,5 e DC20, sendo o DC a droga com menor impacto sobre os atrogenes *MuRF-1* e *Atrogina-1*. DX1,25 e DX2,5 causaram menor expressão de *IRS-1* entre os grupos de glicocorticoides. **Conclusões:** Ômega-3 pode aumentar a atrofia muscular causada por DX em fibras 1 e 2A, possivelmente relacionado com aumento da expressão de FoxO3a, *REDD-1* e *Atrogina-1*, diminuição na expressão de PGC1 α e P-FoxO3a, nas quantidades de ácido araquidônico com aumento da atividade lisossomal. Comparando diferentes glicocorticoides, a MP tende a produzir maior impacto nos pesos corporal e muscular, o DC é menos prejudicial as fibras do tipo 2B, entretanto, afeta predominantemente fibras do tipo 1, da mesma forma que a DX na dosagem de 1,25mg/kg/dia. A DX tende a afetar mais a expressão de Akt total e fosforilado que os demais glicocorticoides. A MP afeta mais a via Ras/Raf/MEK/ERK e expressão de *REDD-1* em relação aos demais glicocorticoides, e o DC e MP mostram maior expressão de Smad2/3 total e fosforilada em relação ao DX após 10 dias de administração.

Descritores: atrofia muscular; ácidos graxos ômega-3; glucocorticoides; metilprednisolona; dexametasona; deflazacorte; autofagia; fator de crescimento insulín-like; miostatina; quinases de proteína quinase ativadas por mitógeno.

ABSTRACT

Fappi A. *Effects of different glucocorticoids on molecular pathways regulating muscle trophism in rats and the effect of EPA / DHA on muscle atrophy induced by dexamethasone* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Several conditions may be related to muscle atrophy, such as inactivity, aging, septicemia, diabetes, cancer and use of glucocorticoids. In a previous attempt to prevent such glucocorticoid catabolic condition, through the supplementation of omega-3 (N-3), we observed a worsening of muscular atrophy, affecting more types of muscle fibers, usually spared by glucocorticoid, type 1 fibers for example. However, it was not possible to determine the properties of this interaction. Therefore, the objective of this study was to evaluate the action of omega-3 associated with dexamethasone and different glucocorticoids in equipotent dose on body weight; muscle cross-sectional area; fatty acid profile; gene expression of muscle transcription factors and atrogenes (*Atrogin-1* and *MuRF-1*); protein expression of IGF-1/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK and Myostatin/Smad2/3 pathways components; and expression of glucocorticoid receptors in the skeletal musculature of rats. **Methods:** Wistar rats given orally or not with omega-3 (100mg/kg/day of EPA) for 40 days received subcutaneous dexamethasone (DX) (2.5 or 1.25mg/kg/day) during the last 10 days of supplementation. For the other glucocorticoids, rats without supplementation received deflazacorte (DC) or methylprednisolone (MP) in dose/volume equivalent to that of dexamethasone (DC 10 or 20mg/kg/day and MP6.7 or 13.3mg/kg/day) for 10 days. Comprising 10 groups: CT, N-3, DX1.25, DX2.5, DX1.25 + N-3, DX2.5 + N-3, MP6, MP13, DC10 and DC20. Through histological, immunohistochemical, real-time PCR and Western blotting, we evaluated the transverse area of the different muscle fibers; the expression of glucocorticoid receptor; the gene expression of atrogenes and transcription factors; protein expression of the IGF-1, Myostatin and MEK/ERK pathways. **Results:** N-3 administration influenced DEXA atrophy causing increased atrophy in type 1 and 2A fibers, increased protein expression of total FoxO3a, P-Smad3, LC3-II, and REDD-1 gene (mRNA), *Atrogin-1/MAFbx* isolated omega-3 reduced the expression of P-FoxO3a, PGC1 α , the amount of arachidonic acid and the expression of *IRS-1* mRNA with increased expression of LC3-II. The comparison between glucocorticoids showed that MP13 had a greater impact on body and muscle weight; the DC10 caused less atrophy in 2B fibers in relation to the other glucocorticoids. DX, caused greater impact on total Akt compared to the other glucocorticoids, in P-Akt the DX1.25 group had lower expression to other equipotent dose glucocorticoids. All glucocorticoids affect the expression of P-FOXO3a. In the of ERK1/2 and P-ERK1/2 protein expression, the MP6 was the group with the greatest damage to the phosphorylation in relation to the others in equipotent dose. In the evaluation of the Myostatin/Smad2/3 pathway MP 6, MP13 and DC20 showed higher expression of total Smad2/3 and P-Smad3. The gene expression of *REDD-1* and *MYOD* was increased in the MP6 and MP13 groups compared to the other groups, *REDD2* in the DC20 group was lower in relation to the DX2.5 group. Myostatin expression was lower in the DX2.5 and DC20 groups, with DC being the drug with less impact on atrogenes *MuRF-1* and *Atrogin-1*. DX1.25 and DX2.5 caused lower *IRS-1* expression among the glucocorticoid groups. **Conclusions:** Omega-3 may increase muscle atrophy caused by DX in fibers 1 and 2A, possibly related to increased expression of FoxO3a, *REDD-1* and *Atrogin-1*, decreased expression of PGC1 α and P-FoxO3a, in the amounts of acid arachidonic with increased lysosomal activity. Comparing different glucocorticoids, MP tends to produce a greater impact on body and muscular weights, DC is less harmful to type 2B fibers, however, it predominantly affects type 1 fibers, in the same way as DX in the dosage of 1.25mg/kg/day. DX tends to affect total and phosphorylated Akt expression more than other glucocorticoids. MP affects more the Ras/Raf/MEK/ERK pathway and *REDD-1* expression in relation to the other glucocorticoids, and DC and MP show a higher expression of total and phosphorylated Smad2/3 compared to DX after 10 days of administration.

Descriptors: muscular atrophy; fatty acid, omega-3; glucocorticoids; dexamethasone; methylprednisolone; deflazacort; autophagy; insulin-like growth factor I; myostatin; mitogen-activated protein kinase kinases.

INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da massa muscular depende essencialmente da dinâmica de dois processos regulatórios que se opõem: síntese e degradação proteica muscular, uma desregulação entre esses dois processos gera uma resposta de trofismo muscular correspondente com o lado estimulado, gerando hipertrofia ou atrofia muscular (**Nader, 2005; Matsakas e Patel, 2009**). O processo de atrofia muscular ocorre através de mecanismos que incluem o aumento da degradação proteica e/ou redução da expressão gênica com redução da síntese proteica muscular e encolhimento das miofibras devido à perda da rede de proteínas, organelas e citoplasma (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Boonyarom e Inui, 2006; Schiaffino *et al.*, 2013**).

Estudos têm identificado pelo menos cinco diferentes sistemas envolvidos no processo de atrofia muscular: os sistemas lisossomal, da calpaina, caspases e apoptose, metaloproteinases e o sistema da ubiquitina-proteasomo (SUP) (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Kandarian e Jackman, 2006**). Várias são as condições que podem estar associadas a este estado catabólico denominado “atrofia muscular” incluindo aquelas ligadas a adaptações a condições fisiológicas do organismo como jejum prolongado, inatividade e envelhecimento, bem como em associação com condições patológicas tais como a septicemia, diabetes, caquexia, AIDS, câncer, micro gravidade, lesão medular e doenças geneticamente herdadas como as miopatias e neuropatias, além do uso de glicocorticoides (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Boonyarom e Inui, 2006; Kandarian e Jackman, 2006; Sandri *et al.*, 2006; Stewart e Rittweger, 2006; Pereira e Freire de Carvalho, 2011**).

Os glicocorticoides sintéticos representam um dos compostos terapêuticos mais utilizados na prática médica, sendo amplamente empregados no tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e linfoproliferativas (**Nicolaides *et al.*, 2010**), entretanto, seu uso pode acarretar reações adversas que são dependentes da dosagem, regime de administração, modo de aplicação e tempo de uso, causando impacto em diversos sistemas orgânicos, tais como: gastrointestinal, dermatológico, neurológico, endocrinológico, oftalmológico, cardiovasculares e musculoesqueléticos, sendo os principais efeitos adversos sobre o sistema musculoesquelético a miopatia/atrofia muscular, osteoporose, necrose óssea (cabeça do fêmur e do úmero), fratura patológica dos ossos longos e ruptura de tendões (**Schacke *et al.*, 2002**).

Nesse tipo de atrofia, as fibras musculares mais acometidas são as do tipo 2 (contração rápida), particularmente as fibras do tipo 2B ou 2X, com pouco ou nenhum efeito sobre as fibras

do tipo 1 (contração lenta) (Sandri *et al.*, 2006; Matsakas e Patel, 2009; Schakman *et al.*, 2009; Pereira e Freire de Carvalho, 2011; Schiaffino e Reggiani, 2011).

Sabendo os mecanismos envolvidos na atrofia muscular, o principal objetivo terapêutico seria o de modular alvos intracelulares indutores da atrofia muscular, tais como os fatores de transcrição FoxO ou da via NF- κ B e também o de promover inibição direta da via SUP (Tisdale, 2006). Alguns candidatos para atenuação da atrofia muscular que mostraram efeitos benéficos são a testosterona (Qin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010), creatina (Menezes *et al.*, 2007), HMB (metabólito da leucina) (Wyke *et al.*, 2004) entre outros. Entretanto, o uso de ômega-3 (ácido graxo poli-insaturado) associado a dexametasona causou aumento da atrofia muscular em fibras usualmente poupadas e aumento da expressão de *Atrogina-1* (Fappi *et al.*, 2014).

Dois tipos de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, *poly unsaturated fatty acid*) não são produzidos pelo nosso organismo, sendo, portanto, classificados como ácidos graxos essenciais, que formam a base para a produção de duas famílias de ácidos graxos, conhecidos como Ômega-3 (n-3) e Ômega-6 (n-6) (Calder, 1998; Leonard *et al.*, 2004). Na família n-3, os principais ácidos graxos são o ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5 n-3), o ácido docosaexaenoico (DHA) (C22:6 n-3) e o ácido α -linolênico (ALA) (C18:3 n-3), encontrados principalmente em sementes de oleaginosas e alimentos de origem marinha (Calder, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Garófolo e Petrilli, 2006). Seu consumo é altamente recomendado, trazendo inúmeros benefícios para o organismo, incluindo a memória e o sistema cardiovascular, benefícios mais conhecidos (Davignus *et al.*, 1997; Delgado-Lista *et al.*, 2012; Vannice e Rasmussen, 2014). Vários estudos têm demonstrado que a suplementação de EPA e n-3 é capaz de atenuar a atrofia muscular associada ao câncer, privação alimentar e septicemia, auxiliando na redução da atividade de componentes do SUP, estando relacionado com a modulação do via do NF- κ B (Whitehouse *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Tisdale, 2007; Khal e Tisdale, 2008).

Entretanto, em um estudo recentemente realizado por nós, com o objetivo de avaliar o efeito do Ômega-3 no desenvolvimento da atrofia muscular induzida pelo dexametasona em ratos observamos que a associação da dexametasona (5mg/kg/dia) com o Ômega-3 (EPA/DHA), ocasionou maior prejuízo muscular que em comparação com a dexametasona de forma isolada, com maiores níveis de atrofia musculares em fibras do tipo 1 e 2A associado a uma maior expressão de atrogenes como *Atrogina-1* e diminuição na miogênese muscular, com diminuída expressão da *Miogenina* (*MYOG*) (Fappi *et al.*, 2014). Porém, não foi possível determinar quais foram os mecanismos responsáveis por essa interação. Sendo este o foco deste estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O tecido muscular esquelético

O tecido muscular esquelético é o mais abundante no corpo humano, correspondendo cerca de 30 a 40% da massa corporal de um ser humano adulto (**Nader, 2005; Schiaffino e Reggiani, 2011; Nedergaard *et al.*, 2013**). Sua função fundamental está relacionada com a manutenção postural, controle do movimento voluntário e locomoção, que permite ao ser humano realizar suas funções essenciais do dia-a-dia (**Reid e Fielding, 2012; Rizzi *et al.*, 2012**). Porém, também está diretamente relacionado com a homeostase do organismo, representando a maior reserva de glicose do corpo e possui uma enorme reserva de amino ácidos que são disponibilizados ao organismo diante de situações de estresse energético como no jejum, fornecendo o esqueleto de carbono para a gliconeogênese hepática (**DeFronzo *et al.*, 1985; Shulman *et al.*, 1990; Brook *et al.*, 2016**).

É um tecido que apresenta grande capacidade de adaptação a demandas funcionais, seja através de atrofia ou de hipertrofia musculares (**Guyton, 2002; Schiaffino *et al.*, 2013**), além de capacidade de se regenerar após lesões, mesmo que severas, retornando a sua função primária de contrair (**Lepper *et al.*, 2011**).

O tecido muscular esquelético constitui-se de células multinucleadas de aspecto poligonal, com diâmetros que variam entre 10 e 80µm, denominadas fibras musculares, ou miócitos, com os núcleos posicionados ao longo da periferia da fibra, subjacente à membrana plasmática, ou sarcolema. As fibras musculares são quase que completamente preenchidas por miofibrilas, e estas são constituídas por sarcômeros (**Figura 1**), unidade contrátil muscular (**Guyton, 2002; Charge e Rudnicki, 2004; Floeter, 2009**).

Figura 1: Sarcômero e sua estrutura. Ilustração superior apresenta as proteínas miofibrilares em sua organização: actina (*actin*) e miosina (*myosin*) juntamente com seus componentes na sua disposição longitudinal, com o filamento de titina, em lilás (*titin filament*) partindo da disco Z do sarcômero. A imagem inferior mostra eletromicrografia de um sarcômero completo em posição correspondente à imagem superior. Legenda: Z= disco Z; M= banda M; I= banda-I; A= banda-A; α *actin*= alfa actina; *desmin*= desmina; *nebulin filament*= filamento de nebulina; *troponins*=troponinas; *tropomyosin*= tropomiosina; *thin filament*= filamento fino; *thick filament*= filamento grosso (Ottenheijm *et al.*, 2008).

Originalmente, as fibras musculares são classificadas em três tipos básicos: tipo 1, tipo 2A e tipo 2B, correspondendo ao tipo de miosina de cadeia pesada (MyHC) presente. Também há uma forma adicional, híbrida, chamada de 2C, que pode se converter em outras formas. No entanto, 8 diferentes isoformas de MyHC estão bem caracterizadas: 1, 2A, 2X, 2B, α -cardíaca, embrionária; perinatal e extraocular (Soukup *et al.*, 2009; Schiaffino e Reggiani, 2011). Em humanos há basicamente fibras musculares do tipo 1, 2A e 2X, esta última anteriormente classificada como 2B, com diferentes propriedades contráteis musculares de acordo com o tipo de miosina (Gundersen, 2011).

Tipo de MyHC	Tempo de contração	Velocidade de encurtamento	Área de secção transversa	Metabolismo	Resistência	Eficiência energética
1	lenta	lenta	pequena	oxidativo	alta	alta
2A
2x						
2B	rápida	rápida	grande	glicolítico	baixa	baixa

Figura 2: Propriedades contráteis dos diferentes tipos de fibras musculares (modificado de Gundersen, 2011).

A contração da fibra muscular acontece basicamente em razão do deslizamento entre os filamentos grossos (miosina) e finos (actina) dentro do sarcômero, sendo o modo de organização destes filamentos que dá ao músculo sua aparência estriada (Agarkova e Perriard, 2005). Tais filamentos, finos e grossos, são montados em paralelo através de duas estruturas transversais, o disco Z e a banda M, responsáveis pelo ancoramento de filamentos finos antiparalelos e sarcômeros adjacentes e pela regulação da organização e alinhamento adequado dos filamentos grossos durante a miogênese (Agarkova e Perriard, 2005). De forma um pouco mais descritiva, os filamentos finos constituem-se de actina entrelaçada por tropomiosina e troponina, sendo esta última uma proteína de ligação com o cálcio, já os filamentos grossos consistem apenas em miosinas, formadas por uma cauda e uma cabeça globular (Schiaffino e Reggiani, 2011).

2.2. Miogênese e fatores de transcrição muscular

Durante o desenvolvimento embrionário, a especificidade das células precursoras mesodérmicas, originadas dos somitos, em linhagem miogênica, requer aumento da expressão dos genes *MyoD* e *Myf5*, ativadores transcricionais da família dos fatores regulatórios miogênicos (MRF, do inglês *Myogenic Regulatory Factors*) (Charge e Rudnicki, 2004). Células proliferativas miogênicas positivas para *MyoD* e/ou *Myf5* são chamadas de mioblastos. Mioblastos proliferativos saem do ciclo celular e tornam-se diferenciados em miócitos que expressam MRFs tardios, Miogenina (*MyoG*) e *MRF4* e, subsequentemente, genes específicos musculares, tais como aqueles que codificam miosinas de cadeia pesada (MyHC) e creatinofosfoquinase (CPK). Por fim, miócitos mononucleares fundem-se para formarem células multinucleadas que amadurecem em fibras musculares contráteis.

Durante o desenvolvimento muscular, uma subpopulação distinta de mioblastos não entra em diferenciação, porém, mantém-se associada à superfície das fibras em desenvolvimento, sendo denominadas células satélites quiescentes. Desta maneira, após sua maturidade, o músculo esquelético torna-se um tecido caracterizado por fibras musculares multinucleadas pós-mitóticas (**Charge e Rudnicki, 2004**).

O músculo esquelético possui capacidade de regeneração rápida e completa após dano muscular e, para tal, eventos bioquímicos e moleculares recapitulam aqueles ocorridos durante o desenvolvimento embrionário (**Charge e Rudnicki, 2004**). Em um evento de dano muscular ocorre ativação de resposta inflamatória e proliferação celular da linhagem miogênica (células satélites). Após exposição a sinais químicos liberados na região do dano, as células satélites quiescentes passam para o estágio de células miogênicas precursoras ou mioblastos, podendo ainda participar do processo de hipertrofia muscular (**Pallafacchina et al., 2013**).

Em nível molecular, a ativação das células miogênicas precursoras resultam na expressão de MRFs, como Myf5 e MyoD, que ocorre já nas primeiras 12 horas após o dano muscular (**Charge e Rudnicki, 2004**). Já as células satélites quiescentes não expressam níveis detectáveis de MRFs. O MyoD tem importância fundamental na diferenciação das células satélites, enquanto que o Myf5 na promoção de autorenovação destas células. Após este evento inicial, as células musculares recém-formadas se diferenciam e fundem-se, associando-se com as fibras lesadas para formar novas fibras musculares. Ocorre ativação dos genes *MyoG* e *MRF4* e expressão de proteínas responsáveis pela parada do ciclo celular, como a p21 (**Charge e Rudnicki, 2004**). O programa de diferenciação celular é então completado com o início da expressão de proteínas musculares específicas, como as miosinas, e a fusão das células miogênicas precursoras com as células musculares lesadas.

2.3. Atrofia muscular esquelética

A aquisição, manutenção, ou perda de massa muscular dependem essencialmente da dinâmica de dois processos regulatórios que se opõem: síntese e degradação proteica muscular, uma desregulação entre esses dois processos regulatórios gera uma resposta de trofismo muscular correspondente com o lado estimulado, gerando hipertrofia (aumento da massa muscular) ou atrofia muscular, correspondente à perda da massa muscular decorrente de redução da área das fibras musculares e/ou redução da quantidade de suas fibras (**Nader, 2005; Matsakas e Patel, 2009**). Várias condições que podem estar associadas a este estado catabólico, incluindo aquelas ligadas a adaptações a condições fisiológicas do organismo como jejum prolongado, inatividade e envelhecimento, bem como em associação com condições

patológicas tais como a septicemia, diabetes, caquexia, AIDS, câncer, micro gravidade, lesão medular e doenças geneticamente herdadas como as miopatias e neuropatias, além do uso de glicocorticoides (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Boonyarom e Inui, 2006; Kandarian e Jackman, 2006; Sandri *et al.*, 2006; Stewart e Rittweger, 2006; Pereira e Freire de Carvalho, 2011**).

Tipicamente, a massa muscular, também denominada massa magra, permanece estável até a vida adulta, representando até 50% da massa corporal de um adulto jovem. No entanto, após os 50 anos a massa é perdida na ordem de aproximadamente 1% ao ano em homens e 0,5% em mulheres, passando a representar apenas 25% da massa corporal entre os 75-80 anos de idade (**Short *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2012**). Da mesma forma é observada diminuição de força muscular na ordem de 15% de perda por década (**Keller e Engelhardt, 2013**), com impacto observado principalmente entre 60 – 70 anos, quando a perda de força ultrapassa a perda de massa, e se torna mais nítido o início da deterioração da função muscular que resulta com o tempo em prejuízo na qualidade da mobilidade e função humanas (**Kalyani *et al.*, 2014**).

O processo de atrofia muscular ocorre através de mecanismos que incluem o aumento da degradação proteica e/ou redução da expressão gênica com redução da síntese proteica muscular e encolhimento das miofibras devido à perda da rede de proteínas, organelas e citoplasma (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Boonyarom e Inui, 2006; Schiaffino *et al.*, 2013**). Estudos têm identificado pelo menos cinco diferentes sistemas envolvidos no processo de atrofia muscular: os sistemas lisossomal, da calpaina, caspases e apoptose, metaloproteinases e o sistema da ubiquitina-proteasomo (SUP) (**Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003; Kandarian e Jackman, 2006**). Dentre todos os sistemas envolvidos na atrofia muscular os principais envolvidos são o SUP (ativo em praticamente todas as formas de atrofia) e o autofágico lisossomal (**Hershko e Ciechanover, 1998; Schiaffino *et al.*, 2013**).

2.3.1. Sistema da ubiquitina-proteasomo (SUP)

O SUP caracteriza-se pela habilidade de reconhecer, ubiquitinar e marcar como alvo proteínas específicas para degradação, atuando em resposta a mudanças na atividade muscular (**Verhees *et al.*, 2011; Schiaffino *et al.*, 2013**). Proteínas degradadas pelo SUP são primariamente ligadas de forma covalente às cadeias de moléculas de ubiquitina, responsáveis por marcar as proteínas e as direcionar a uma rápida degradação no proteasomo 26S (**Hershko e Ciechanover, 1998; Livneh *et al.*, 2016**).

A formação de um complexo ubiquitina-proteína envolve a participação de pelo menos três componentes: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ligadora de ubiquitina (E3). Em uma etapa inicial, ocorre a ativação da ubiquitina pela enzima E1; em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para a enzima E2, liberando a enzima E1. Após ubiquitinada, a enzima E2 liga-se à enzima E3 previamente ligada à proteína-alvo (substrato) em um complexo não covalente, de modo que a ubiquitina ativada seja transferida da E2 para o substrato. O complexo de ligação entre E2 e E3+substrato então se solta, liberando a enzima E2 e a proteína, neste momento ubiquitinada. As etapas anteriores se repetem algumas vezes formando uma ou mais cadeias de ubiquitina na proteína-alvo, cadeias essas que se ligam a receptores de ubiquitina presentes na região 19S do proteassomo (**Vilchez *et al.*, 2014; Livneh *et al.*, 2016**). A especificidade do substrato é mediada por pelo menos três grupos de enzimas ligadoras E3: *RING finger*; homóloga ao domínio terminal carboxil E6AP (domínio HECT); e complexo de proteínas Skp1–Cul1–F-box (complexo SCF) (**Powell, 2006**).

Durante o processo de atrofia muscular vários componentes do SUP são expressos mais intensamente, incluindo as E1, E2, E3s, 26S e ubiquitina (**Medina *et al.*, 1995**). Em eucariotos, uma família de três genes (*UbA*, *UbB* e *UbC*) codificam produtos de proteína que são processados para formar ubiquitinas livres (**Jentsch *et al.*, 1991**). Em um estado de catabolismo muscular, o mRNA *UbC* é tipicamente aumentado em comparação à demais mRNAs de ubiquitinas, sendo seus níveis aumentados em cerca de 2x em ensaios de lesão muscular por deservação, jejum prolongado e pelo uso de glicocorticoides (**Wing e Goldberg, 1993**). Uma vez que houve o aumento no mRNA da ubiquitina, parece provável que o aumento da transcrição de *UbC* é um componente integral do programa de resposta que resulta na atrofia muscular.

No entanto, grande avanço no conhecimento do envolvimento do SUP no processo de atrofia muscular ocorreu com a identificação de dois genes de ligadoras E3 as quais se expressam significativamente em diferentes modos de atrofia muscular: *MuRF1* (*Muscle ring finger 1*) e a *Atrogina-1/MAFbx* (Atrogina 1, *Muscle atrophy F-box*) (**Bodine *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2001**).

Vários estudos têm demonstrado a importância de ligadoras E3 na fisiologia e remodelamento do sarcômero. A MuRF1, por exemplo, se associa à titina (proteína sarcomérica gigante que participa da estabilização da linha M do sarcômero) e também à troponina-I (proteína com alta afinidade pela actina), promovendo ubiquitinação e degradação de ambas (**McElhinny *et al.*, 2002**). Fielitz *et al.* (2007a) demonstraram que a MuRF3 interage e participa do processo de degradação da γ -filamina. Em outro estudo os mesmos autores demonstraram

que as ligadoras (E3) MuRF1 e MuRF3 atuam em cooperação na degradação de MyHC- β e 2A via SUP (Fielitz *et al.*, 2007b). Camundongos com deficiência de ambas isoformas de enzimas E3 (MuRF1 e MuRF3) desenvolvem miopatia e cardiomiopatia hipertrófica caracterizadas pelo acúmulo de MyHC, fragmentação das fibras e diminuição do desempenho muscular. Tal achado reforça o envolvimento de enzimas ligadoras E3 na renovação de proteínas sarcoméricas e ajuda a esclarecer aspectos patogênicos de miopatias com acúmulo de miosina.

Li *et al.* (2004) demonstraram que a Atrogina-1/MAFbx interage com a calcineurina-A e com a α -actinina-2 nas linhas Z das células cardíacas, além de atuar na ubiquitinação e degradação da calcineurina-A, regulando o processo de hipertrofia cardíaca que ocorre em decorrência de diversos estímulos patogênicos.

No entanto, algumas ligadoras E3 são expressas mais intensamente durante o processo de crescimento e regeneração muscular e não na atrofia muscular, indicando que os processos de ubiquitinação e degradação proteica também ocorrem em condições de crescimento e maturação celular (Delaunay *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2010).

Algumas ligadoras E3 podem estar envolvidas em diferentes processos e modelos de atrofia muscular específicos. A enzima ligadora E3 Nedd4-1, por exemplo, atuaria no processo de atrofia muscular por desuso, tendo ainda papel adicional na miogênese, enquanto que a E3 Mull atuaria na atrofia induzida pelo jejum prolongado (Schiaffino *et al.*, 2013). Descobriu-se que a proteína Trim32 é uma ligadora E3, crucial para a degradação de filamentos finos (actina, troponina e tropomiosina), α -actina e desmina (Kudryashova *et al.*, 2012).

2.3.2. Atrofia relacionada à via do IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR

O IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) é um fator de crescimento produzido em sua maior parte no fígado (eixo GH/IGF-1), que estimula o aumento da síntese proteica muscular e consequentemente de sua massa, além de diminuir os níveis de proteólise e apoptose neste tecido. Entretanto, o IGF1 também é produzido em múltiplos tecidos extra-hepáticos, atuando de forma autocrina/parácrina (Perrini *et al.*, 2010). Foi demonstrado a existência de três isoformas de IGF-1 em humanos (IGF-1Ea, IGF-1Eb e IGF-1Ec) e duas em camundongos (IGF-1Ea e IGF-1Eb) produzidas por *splicing* alternativo no gene *IGF1* (Kandalla *et al.*, 2011). O IGF1Ea, produzido no fígado e músculo, também referido como IGF1 sistêmico é o mais abundante sendo a principal forma de atuação como agente anabólico (Goldspink e Yang, 2004) e o IGF1Eb (em roedores) e IGF1Ec, produzidos principalmente pelo músculo esquelético, são referidos como mecano fator de crescimento (MGF, do inglês, *mechano growth*

factor) é detectável no músculo esquelético apenas após lesão ou esforço mecânico, atuando como um fator de crescimento/reparação (**Goldspink e Yang, 2004; Kandalla et al., 2011**).

Entretanto, quando a ação do IGF-1 sobre o músculo esquelético é inibida, como por exemplo, após a administração de glicocorticoides, ocorre uma elevação nos níveis de degradação proteica associada a diminuição na síntese proteica com consequente redução do trofismo muscular, consequente da interrupção da cascata de sinalização da via, podendo conduzir à um estado de atrofia (**Florini et al., 1996; Schakman et al., 2009; Qin et al., 2013**).

Após a ligação do IGF-1 com o seu receptor (tirosina quinase), estes ligantes recrutam a atividade de muitas proteínas, incluindo os substratos do receptor da insulina (IRS – *Insulin receptor substrate*) IRS1 e IRS2, que conduzirá à ativação do PI-3K (proteína quinase fosfoinositídeo-3K) que por sua vez leva a formação de fosfatos fosfatidilinositol que se inter-relacionam até sua interação com o Akt, também conhecido como PKB (*Protein Kinase-B*), sendo então fosforilado pelas quinases dependentes de fosfatidil. A ativação do Akt leva a consequente inibição e ativação de diversas proteínas relacionadas com a síntese e degradação proteica e com captação de glicose celular. O Akt quando fosforilado acarreta ativação do mTOR (*mammalian target of rapamycin*), relacionado com aumento da síntese proteica, e inibe proteínas relacionadas com degradação ou diminuição da síntese proteica muscular como o GSK3 β (glicogênio sintetase 3 β) e FoxOs (*Forkhead box O*), levando a um aumento da massa muscular e consequente hipertrofia (**Jefferson et al., 1999; Bodine et al., 2001b; Leger et al., 2006; Gundersen, 2011**).

A ação inibitória do Akt sobre o GSK3 β , supressor do fator de iniciação eucariótico 2B (eIF-2B), resulta em aumento da translação de mRNA, da capacidade de reciclagem dos ribossomos e assim aumentando a síntese de proteínas em fases iniciais (**Dufner et al., 1999; Clemmons, 2009; Verhees et al., 2011**). A presença do GSK3 β , em modelo de atrofia com dexametasona, é fundamental para a expressão de genes das enzimas E3 do SUP, *MuRF-1* e *Atrogina-1/MAFbx* (**Verhees et al., 2011**). O GSK3 β também se relaciona com a síntese de glicogênio, tendo sido relacionada sua alta expressão com a intolerância à glicose e prejuízo sobre a ação da insulina (**Dokken et al., 2005**).

Os Foxs constituem uma família (*winged helix/forkhead transcription factor Family*) de fatores de transcrição com mais de 100 membros que, quando ativos, localizam-se predominantemente no compartimento nuclear ligados ao DNA (**Kaestner et al., 2000; Song et al., 2015**). Os Foxs são classificados em 23 subclasses de família, organizado por análise filogenética, determinadas por letras, que variam de FoxA à FoxS (**Kaestner et al., 2000**), embora existam estudos que sugiram mais subdivisões de classe (**Yu et al., 2008**). Existem

diferentes funções/tecidos predominante relacionados com cada subclasse e Fox, que vão de desenvolvimento neural e longevidade ao desenvolvimento de tumores e apoptose (**Zhang et al., 2011; Song et al., 2015**). Os membros da classe FoxO (FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6) estão diretamente relacionados com a sinalização IGF-1/Insulina, e regulam genes da via proteolítica do SUP, em particular os genes codificadores das enzimas E3 (*MuRF-1 e Atrogina-1/MAFbx*), bem como genes relacionados com a autofagia, reguladores do crescimento (Miostatina) e de degradação celular (Catepsinas) (**Sandri et al., 2004; Mammucari et al., 2007; Hasselgren et al., 2010**). Os FoxOs 1 e 3a são responsáveis pela transcrição de atrogenes como *MURF-1 e Atrogina-1/MAFbx (Atrogina-1)*, influenciando na degradação muscular pela maior ativação do SUP (**Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004; Schakman et al., 2008**).

A atividade dos FoxOs é estritamente relacionada com modificações pós tradução com fosforilação (Akt-dependente), ubiquitinação e acetilação (**van der Horst e Burgering, 2007**). A inativação dos FoxOs pelo Akt ocorre mediado pela associação com as proteínas 14-3-3, capazes de “sequestrar” e translocar os FoxOs para o sarcoplasma (citoplasma da fibra muscular) onde são mantidos fosforilados e transcricionalmente inativos (**Birkenkamp e Coffey, 2003; Sandri et al., 2004**). Por outro lado, com a inativação/supressão da atividade do Akt, os FoxOs são translocados novamente para o núcleo onde exercem sua atividade de transcrição gênica dando início ao processo de atrofia muscular, como ocorre por exemplo na atrofia muscular induzida por glicocorticoides (**Van Der Heide et al., 2004; Schakman et al., 2008**).

Outra função do Akt está na ativação do mTOR, formando um complexo chamado mTORC1, com a propriedade de ativar a proteínas relacionadas com a iniciação de síntese proteica, como o 70 kDa S6 quinase (P70^{S6K}), importante para a tradução proteica, além de inibir o 4EBP1 (*factor 4E binding protein 1*) uma proteína que atua inibindo fatores translacionais, favorecendo, assim, a síntese proteica (**Bodine et al., 2001b; Clemmons, 2009**).

Vários estudos utilizando diferentes modelos de indução de atrofia muscular *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a ativação do Akt previne os efeitos da atrofia muscular induzida por glicocorticoides, através da inativação dos FoxOs (**Bodine et al., 2001b; Sandri et al., 2004; Schakman et al., 2008**).

Dois genes indutores de hipóxia denominados *Scylla* e *Charybdis* foram identificados em *Drosophila* como reguladores negativos da via TOR e do crescimento celular, sendo denominados *REDD1* e *REDD2* (**Miyazaki e Esser, 2009**). O *REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1)* é um componente presente na resposta ao estresse

e tem sua transcrição aumentada em casos de estresse energético, tratamento com glicocorticoides e estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2006; Katiyar *et al.*, 2009). Dentre suas funções está a regulação e, principalmente, inibição do mTOR durante estresse por hipóxia, sendo sua função dependente de proteínas 14-3-3 e do complexo TSC (*tuberous sclerosis complex*). Sua degradação se dá via SUP por sinalização de enzima E3 específica (E3-CUL4A–DDB1–ROC1–b-TRCP), sendo necessária sua degradação para restauração completa da atividade de mTOR (Katiyar *et al.*, 2009).

A expressão de REDD2 é predominante no músculo esquelético, sendo este considerado um regulador negativo da sinalização do mTOR, atuando independentemente da sinalização de Akt, sendo entretanto, dependente da atividade da pequena proteína G Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), do complexo TSC1 e, de forma não completamente elucidada, das proteínas 14-3-3 (Miyazaki e Esser, 2009).

2.3.3. Via de sinalização MEK/ERK na atrofia muscular

Uma vez feita a ligação do IGF-1 ao seu receptor, os substratos do receptor da insulina presentes neste receptor (IRS1 e 2) conduzem, além da via PI-3k/Akt/mTOR, a ativação adicional da via Ras/Raf/MEK/ERK (Shi *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2010). O MEK (*extracellular signal–regulated kinase*) e ERK (*extracellular signal–regulated kinase*) estão relacionada com a regulação da massa muscular (Shi *et al.*, 2007) e demais funções celulares que incluem proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência de células mitose competentes (Kolch, 2000; Glass, 2003). No entanto, sua função ainda é incerta, segundo o estudo de Rommel *et al.* (1999) a via Ras/Raf/MEK/ERK no músculo maduro é inativada, mostrando papel oposto na hipertrofia, comparada a via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR, sendo, portanto, dependente do estado de diferenciação celular. Em miotubos diferenciados o Akt inibe a via MEK/ERK, o que não ocorre mioblastos precursores.

A ativação do Raf por fosforilação conduz a uma ativação tanto de MEK1 quanto MEK2 (também conhecidos como MKK1 e 2, respectivamente) e, uma vez ativados, conduzem a ativação de ambas ERK1 e ERK2 (também conhecido como p44 e 42 MAPK, respectivamente) (Kolch, 2000). Estudos sugerem que suas funções são equivalentes, não sendo completamente elucidada a razão da existência de dois genes ERK (Kolch, 2000).

Estudos *in vitro* com células C2C12 mostram que a forma ativa de Raf-1 conduz as fibras musculares a formação de filamentos finos, enquanto que a forma ativa de Akt conduz a formação de filamentos grossos, hipertróficos. Tal inibição hipertrofica, conduzido pelo Raf-1 ativo, resulta na diminuição de expressão da *Miogenina*, estando aumentada apenas na presença

de Akt ativo (Rommel *et al.*, 1999). Mostrando que suas atuações são inversas, uma via favorecendo a hipertrofia (PI-3k/Akt/mTOR) e outra a desfavorecendo.

Zheng *et al.* (2010) mostraram ainda que os FoxOs, em particular o FOXO3a, quando ativos podem aumentar os níveis proteicos de IRS-2 no músculo esquelético, induzindo a uma maior atividade da via MEK/ERK e Sp1 com consequente maior ativação de UbC, conduzindo à atrofia muscular (Figura 3).

Figura 3: Resposta das vias PI-3k e MEK/ERK durante atrofia por glicocorticoides (Zheng *et al.*, 2010). Legenda: GC = glicocorticoide; Tradução: *Insulin* = Insulina; *Atrophy* = atrofia.

2.3.4. Via Miostatina/smad2/3 na atrofia muscular

A miostatina (GDF-8 – *growth differentiation factor 8*) é um membro da família do TGF- β (*transforming and growth factors* β) que atua como um forte regulador negativo do crescimento muscular esquelético e pertence à via Miostatina/Smad2/3, via que participa no tecido muscular esquelético inibindo componentes da via do IGF-1 que estão diretamente relacionados com a síntese e degradação proteica, como o Akt, P70S6K, TSC-2 e 4EBP1 (Amirouche *et al.*, 2009). Mutações naturais ou nocautes experimentais na produção da miostatina conduzem a um fenótipo de hipertrofia e hiperplasia musculares, que podem dobrar a quantidade de massa muscular sem aumento correspondente de força (McPherron e Lee, 1997; Zimmers *et al.*, 2002).

Após sua ligação com receptor específico (receptor de activina tipo IIb) a miostatina acarreta ativação dos fatores de transcrição Smad2 e Smad3 facilitando a ativação de FoxO's,

principalmente FOXO1, que é translocado ao núcleo onde interagem com coativadores ou cosuppressores nucleares que regulam a transcrição de genes relacionados com a degradação proteica, autofagia, e inibição da diferenciação e proliferação de mioblastos (**Joulia *et al.*, 2003; Rebbapragada *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011; Lokireddy *et al.*, 2011**).

Seus maiores níveis circulantes são observados em modelos de caquexia e atrofia por desuso, gerando aumento de numerosos elementos do SUP incluindo aumento da expressão de enzimas E3 (Atrogina-1 e MuRF-1) com consequente estado de degradação muscular (**Reardon *et al.*, 2001; McFarlane *et al.*, 2006; Amirouche *et al.*, 2009**).

Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que a miostatina possui algum grau de importância na regulação de outros processos além da regulação da massa muscular, como a glicólise (**Chen *et al.*, 2010**), adipogênese (**Feldman *et al.*, 2006**) e homeostase de cardiomiócitos (**Bish *et al.*, 2010**).

Controversamente, a miostatina poderia ainda atuar diretamente nos adipócitos, promovendo proliferação ou diferenciação em um mecanismo inverso ao observado no músculo esquelético (**Elliott *et al.*, 2012**). **Hirai *et al.* (2007)** demonstraram que a miostatina age de forma inibitória na diferenciação celular de pré-adipócitos bovinos, enquanto que **Zimmers *et al.* (2002)** demonstraram que sua alta expressão em camundongos adultos diminui a quantidade de tecido adiposo.

2.4. Glicocorticoides e a atrofia muscular esquelética

2.4.1. Classificação e fisiologia

Os hormônios corticosteroides são produzidos no córtex da glândula suprarrenal, classificados em dois tipos, glicocorticoides e mineralocorticoides, dos quais os mais importantes para o organismo são o cortisol e a aldosterona. Tais hormônios estão envolvidos em quase todas as funções celulares, moleculares e fisiológicas do organismo, tendo papel fundamental em processos biológicos importantes como o crescimento, reprodução, metabolismo, reações inflamatórias e imunológicas, bem como nas funções do sistema nervoso central, cardiovascular e renal regulam o metabolismo dos carboidratos e as funções hemodinâmicas, sendo essenciais para vida, sobretudo em situações de estresse (**Nicolaides *et al.*, 2014**).

O cortisol (corticosterona em roedores), hormônio glicocorticoide, é um hormônio derivado do colesterol produzido, mais precisamente, na *zona fasciculata* do córtex da glândula suprarrenal e está relacionado com diversas funções metabólicas, que incluem a regulação dos níveis glicêmicos e resposta anti-inflamatória e imunossupressora havendo crescentes trabalhos

indicando produção extra-adrenal de cortisol como em órgãos linfoides primários, intestino, sistema cardiovascular, pele, cérebro e sistema nervoso central (**Davies e MacKenzie, 2003; Chrousos et al., 2004; Taves et al., 2011**). Seus níveis séricos atendem a um mecanismo de *feedback* (retroalimentação) negativo dentro do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA), sendo regulado pelo ACTH (*adrenocorticotropic hormone* ou hormônio adrenocorticotrófico) e pelo CRH (*corticotropin-releasing hormone* ou hormônio liberador da corticotrofina) na glândula pituitária e hipotálamo, além de relacionados ao ritmo circadiano, com pico de liberação do cortisol pela manhã em humanos (início da noite em roedores) e queda no decorrer do dia, exercendo importante papel na manutenção do repouso e homeostase relacionada com o estresse (**Taves et al., 2011; Biddie et al., 2012; Kadmiel e Cidlowski, 2013; Nicolaidis et al., 2014**). Sua disponibilidade aos tecidos ocorre mediante associação com a globulina de ligação com corticosteroide (*corticosteroid-binding globulin*), também descrita na literatura como *steroid-binding protein* e seu estado ativo ou inativo depende de atuação enzimática da 11 β -HSD1 (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) que converte a forma inativa “cortisona” em sua forma ativa “cortisol”. Já a 11 β -HSD2 (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2*) catalisa a reação oposta (**Schacke et al., 2002; Clark e Belvisi, 2012**). Entretanto, glicocorticoides sintéticos, com exceção da prednisolona, não possuem afinidade pela globulina de associação aos corticosteroides, estando predominantemente associados à albumina sérica e não sofrem ação enzimática da 11 β -HSD1 ou 2, estando, portanto, em forma ativa desde sua absorção pelo organismo, o que aumenta a sua biodisponibilidade aos tecidos (**Schacke et al., 2002; Kadmiel e Cidlowski, 2013**).

2.4.2. Mecanismo de ação celular

Em nível celular, a ação do cortisol é mediada por uma proteína intracelular, o receptor de glicocorticoide (GR – glucocorticoid receptor), que ao fazer ligação com o glicocorticoide é translocado ao núcleo, onde se liga ao elemento de resposta ao glicocorticoide (GRE) no DNA, realizando a transativação ou transrepressão de genes específicos relacionados a sua ação imunossupressora e anti-inflamatória principalmente (**Kovacs et al., 2005**). O GR pertence a uma superfamília de receptores nucleares esteroides/tireoide/ácido retinoico, sendo classificado como um fator de transcrição ligante-dependente, expresso no meio intracelular que media a ação dos glicocorticoides e influencia funções fisiológicas essenciais para a vida (**Gower, 1993; Nicolaidis et al., 2010**).

Os glicocorticoides sintéticos representam um dos compostos terapêuticos mais utilizados na prática médica, sendo amplamente empregados no tratamento de doenças

inflamatórias, autoimunes e linfo proliferativas (Nicolaidis *et al.*, 2010), além de serem universalmente utilizados no tratamento de doenças neuromusculares como as miopatias inflamatórias e na distrofia muscular de Duchenne (Reed, 2002). Nos EUA a prescrição de glicocorticoides orais ultrapassam U\$10 milhões anuais, somando ganhos de U\$10bi por ano (Schacke *et al.*, 2002).

As propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias dos glicocorticoides incluem a alterações na migração e circulação de leucócitos e alterações específicas nas funções celulares, além de interação direta do receptor ativo sobre fatores de transcrição pró-inflamatórios como NF-K β (*Nuclear Factor K β*) e AP-1 (*Activator Protein 1*) e de fatores de supressão tumoral e tolerância imunológica como o PS3 e STAT's (*Signal transducers and activators of transcription*) sendo estes os resultados esperados para prescrição desta classe de medicamentos (Schacke *et al.*, 2002; Rhen e Cidlowski, 2005; Song e Buttgereit, 2006).

2.4.3. Reações adversas

O uso de anti-inflamatório glicocorticoide pode acarretar reações adversas que são dependentes da dosagem, regime de administração, modo de aplicação e tempo de uso, causando impacto em diversos sistemas orgânicos, tais como: gastrointestinal, dermatológico, neurológico, endocrinológico, oftalmológico, cardiovasculares e musculoesqueléticos, sendo os principais efeitos adversos sobre o sistema musculoesquelético a miopatia/atrofia muscular, osteoporose, necrose óssea (cabeça do fêmur e do úmero), fratura patológica dos ossos longos e ruptura de tendões (Schacke *et al.*, 2002).

O efeito adverso dos altos níveis de cortisol sobre a musculatura esquelética fora primeiramente descrito por **Harvey Cushing** em 1932, na síndrome de *Cushing*, sendo caracterizada por fadiga, fraqueza e atrofia muscular. É a causa de miopatia induzida por droga mais comum, apresentando incidência de aproximadamente 60% (Cushing, 1994; Pereira e Freire de Carvalho, 2011). Nesse tipo de atrofia, as fibras musculares mais acometidas são as do tipo 2 (contração rápida), particularmente as fibras do tipo 2B ou 2X, com pouco ou nenhum efeito sobre as fibras do tipo 1 (contração lenta) (Sandri *et al.*, 2006; Matsakas e Patel, 2009; Schakman *et al.*, 2009; Pereira e Freire de Carvalho, 2011; Schiaffino e Reggiani, 2011).

Alguns indivíduos apresentam particular susceptibilidade para reações adversas causadas pelos glicocorticoides sintéticos, como indivíduos idosos e os portadores de câncer, entretanto, alguns indivíduos apresentam peculiar aumento ou mesmo diminuição da sensibilidade ao glicocorticoide pela presença de polimorfismos no receptor de glicocorticoide (van Rossum e Lamberts, 2004; Nicolaidis *et al.*, 2014). Mutações localizadas em algumas

regiões do receptor podem aumentar a afinidade com o glicocorticoide, causando uma hipersensibilidade e, de forma oposta, uma resistência na ligação do receptor com o glicocorticoide pode representar uma hiposensibilidade ao glicocorticoide, sendo as mutações mais descritas para hipersensibilidade a Bcll, N363S e a T504, todas localizadas no gene *NR3C1* (Vandevyver *et al.*, 2014). Além de hipersensibilidade, a mutação em N363S está relacionada com aumento do IMC (índice de massa corporal), maior relação cintura-quadril, tendência a perda de densidade mineral óssea além de maiores níveis de colesterol e triglicérides com maior incidência de doença coronariana (Nicolaidis *et al.*, 2010). Já o polimorfismo relacionado com restrição do fragmento Bcll (substituição C→G no 647p.b. do exon 2) além da hipersensibilidade, está relacionada com aumento da pressão arterial e adiposidade visceral (van Rossum e Lamberts, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que algumas moléculas estão particularmente envolvidas na sensibilidade aos glicocorticoides como a SGK1 (*serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1*) e o FKBP5 (*FK506 – binding protein 51*) associadas com condições patológicas como depressão (Hartmann *et al.*, 2012; Menke *et al.*, 2013).

2.4.4. Características da atrofia muscular induzida pelos glicocorticoides

A atrofia de fibras do tipo 2 induzida por glicocorticoides já tem sido descrita há mais de 30 anos. Kelly e Goldspink (1982) demonstraram a ocorrência de atrofia do músculo tibial anterior e da musculatura lisa de ratos submetidos a administração dexametasona por 5 dias (Kelly e Goldspink, 1982). Uma das possíveis explicações para a maior sensibilidade desse tipo de fibra aos glicocorticoides seria a baixa expressão de PGC1 α neste tipo de fibra, uma proteína coativadora da família de PPAR γ (*peroxisome proliferatoractivated receptor γ*). Essa proteína age no músculo esquelético como sensor para a contração muscular induzida pelo sistema nervoso, através da sinalização do cálcio. Quando os seus níveis encontram-se reduzidos, como demonstrado no estudo de Sandri *et al.* (2006) e Qin *et al.* (2010) há uma maior expressão de fatores de transcrição FOXO3a no músculo esquelético.

Mesmo com mais de 3 décadas em que se iniciou o uso de glicocorticoides para indução da atrofia muscular, ainda parece não haver na literatura um consenso quanto à dose ideal da dexametasona a ser usada para induzir a atrofia em modelos experimentais *in vivo*. Aparentemente a dose tem sido escolhida empiricamente e tem variado de 0,5 mg/kg/dia (Pinheiro *et al.*, 2009) até 80mg/kg/dia (Nava *et al.*, 1996). De forma pioneira, Kelly e Goldspink (1982), demonstraram atrofia muscular com a dosagem de 2,5mg/kg/dia em ratos, e posteriormente, Kelly *et al.* (1986) realizaram outro estudo com o mesmo modelo de atrofia,

no entanto com a dosagem de 5mg/kg/dia por 5 a 10 dias mostrando atrofia preferencial em musculatura de contração rápida.

O efeito dos glicocorticoides sobre o tecido muscular está associado também com as repercussões relacionadas ao hipercortisolismo, como inibição do transporte de aminoácidos ao músculo, inibição da resposta à insulina e ao IGF-1 com aumento da expressão de miostatina (**Figura 4**), acarretando redução da síntese proteica. Outros efeitos se relacionam com a inibição da miogênese e aumento da atividade proteolítica mediada principalmente pela ativação das vias da SUP e lisossomal (**Schakman *et al.*, 2009; Pereira e Freire de Carvalho, 2011; Schiaffino *et al.*, 2013**). Glicocorticoides são capazes de dobrar a expressão de ubiquitina (*UbC*) em células musculares (L6) através de mecanismos transcricionais, sendo o Sp1 e MEK1 componentes importantes para estimulação do aumento das ubiquitinas, portanto, a resposta transcricional da dexametasona que induz a um aumento da expressão gênica da ubiquitina C (*UbC*) ocorre através da ativação de mecanismos da via MEK/ERK e Sp1 (**Marinovic *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2010**).

Os glicocorticoides induzem a atrofia muscular, ao menos em parte, pela regulação de fatores de transcrição, atrogenes e catepsinas (**Komamura *et al.*, 2003; Schakman *et al.*, 2009**). Há um aumento nos níveis proteicos de GSK3 β (**Verhees *et al.*, 2011**) e REDD1, capaz de reduzir a atividade do mTOR (**Wang *et al.*, 2006**).

caquexia (Combarete *et al.*, 1999; Combaret *et al.*, 2002). Vários estudos têm demonstrado que β -2 agonistas como clenbuterol (Yimlamai *et al.*, 2005), fenoterol (Ryall *et al.*, 2004) e formoterol (Busquets *et al.*, 2004) possuem efeitos potenciais na prevenção da atrofia muscular. Estas drogas anabólicas parecem eficazes devido ao controle da ativação da SUP.

A creatina se mostrou eficaz na atenuação da atrofia muscular induzida por corticoides (Menezes *et al.*, 2007). A suplementação alimentar com leucina, um aminoácido essencial, seria capaz de atenuar a degradação proteica por redução da ação do SUP (Combarete *et al.*, 2005) e também de aumentar a síntese proteica (Yoshizawa *et al.*, 1999). A leucina também participaria da regulação do sistema lisossomal, já que a sua deficiência acarreta ativação da autofagia do sistema lisossomal em cultura de células musculares (Mordier *et al.*, 2000), no entanto, Nicastro *et al.* (2012), demonstraram que a suplementação de leucina associada à dexametasona piorou a resposta à insulina e não preveniu a atrofia muscular observada nos animais.

A testosterona mostrou-se eficaz na prevenção da perda muscular induzida por corticoide através da inibição da atividade do REDD1 sobre o mTOR, da regulação do FOXO1 e PGC-1 α (Qin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010) e da inibição da degradação com estímulo da síntese proteica pela via do IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR (Zhao *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2010). Por fim, é importante ressaltar que o exercício físico é um método eficiente no controle da atrofia muscular, pois leva a um aumento da produção de IGF-1 e redução da ativação dos atrogenes (Jones *et al.*, 2004).

2.5. Ácidos graxos poli-insaturados e sua atuação na atrofia muscular

Nossa alimentação contém uma complexa mistura de nutrientes contendo carboidratos, proteínas e lipídios, sendo essa última uma mistura de diferentes óleos ou gorduras contendo como estrutura básica, o ácido graxo. Nós, seres humanos, consumimos em média 20 diferentes tipos de ácidos graxos, que são classificados em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (Surette, 2008), sendo este último o foco de nosso estudo.

O ácido graxo é construído em uma estrutura de átomos de carbonos e hidrogênio com pouca quantidade de oxigênio, contendo grupos funcionais, como é possível visualizar na **Figura 5**. De acordo com sua estrutura, essas moléculas possuem fundamentalmente propriedades anfipáticas, ou seja, uma região hidrofóbica (cauda) e uma região hidrofílica (cabeça) não sendo solúvel em água, porém solúvel em outros solventes orgânicos, o que confere aos ácidos graxos sua organização nas membranas fosfolipídicas, sendo o principal conteúdo das membranas (Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015).

Figura 5. Estrutura do ácido palmítico (C16:0).

De forma a melhor classificar as gorduras em razão da grande variedade de ocorrências na natureza e suas possíveis conversões criou-se um nomenclatura para determinação dos ácidos graxos iniciando pelo número de carbonos existente em sua cadeia, seguido pelo número de duplas ligações e em que carbono apresenta a primeira dupla ligação à partir do último carbono (carbono ω - ômega) (Das, 2006; Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015). Como exemplo podemos observar o ácido eicosapentaenoico (Figura 6). Seu nome lipídico (20:5 ω -3) indica que este possui 20 carbonos, 5 duplas ligações e sua primeira dupla ligação ocorre 3 carbonos antes do carbono ômega, ou seja, pertence ao grupo ômega-3.

Figura 6. Estrutura do ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3).

Os ácidos graxos podem ser classificados pelo número de duplas ligações em sua cadeia: sem duplas ligações (saturados), com 1 dupla ligação (monossaturado) e com duas ou mais duplas ligações (poli-insaturado) (Das, 2006), no exemplo acima (Figura 6), portanto, observamos um exemplo de ácido graxo poli-insaturado com 5 duplas ligações 20:5.

A forma de ocorrência natural dos ácidos graxos de forma insaturada é chamada de “*cis*”. Contudo tais gorduras também podem adquirir formas diferentes, com estruturação mais saturada, sendo então denominadas “*trans*”, podendo estas ocorrer naturalmente ou no processamento de alguns alimentos, trazendo um impacto negativo na saúde humana (Department of health, 1994; Najbjerg *et al.*, 2011).

As gorduras *trans* formam um soluto leve em temperatura ambiente e causam a elevação de LDL (*low-density lipoprotein*) no sangue humano, aumentando o depósito de colesterol nas artérias, elevando assim o risco de doenças arteriais coronarianas (Reisner *et al.*, 2011).

Dois tipos de ácidos graxos poli-insaturados não são produzidos pelo nosso organismo, sendo, portanto, classificados como ácidos graxos essenciais, que formam a base para a produção de duas famílias de ácidos graxos, conhecidos como Ômega-3 (n-3) e Ômega-6 (n-6). De forma oposta às gorduras *trans* saturadas, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's – *poly unsaturated fatty acid*) geram efeitos benéficos em diversos processos fisiológicos que incluem a função cognitiva, ação anti-inflamatória e imunossupressora, sendo seus principais

representantes os ácidos graxos da família n-3 e n-6 (Calder, 1998; Leonard *et al.*, 2004). O consumo regular de n-3 está relacionado com diminuição de LDL associado com maiores níveis de HDL (*high-density lipoprotein*), além de melhora nos níveis de triglicérides e de outros fatores associados com risco cardiovascular (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003).

Os primeiros benefícios do consumo de n-3 foram relatados em esquimós da Groenlândia que, em razão do alto consumo de alimentos marinhos, apresentavam menores índices de doenças arteriais coronarianas, asma, diabetes tipo 1 e esclerose múltipla (Simopoulos, 2009). Demais benefícios já relatados dos PUFA's incluem ação anti-inflamatória (Kang *et al.*, 2010), melhora da resposta à insulina (Elmore *et al.*, 1999; Haugaard *et al.*, 2006; Haugaard *et al.*, 2009), alívio de doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide e psoríase (Simopoulos, 2002) e melhora de quadros depressivos e demenciais (Bourre, 2005; Freeman *et al.*, 2006; Lin e Su, 2007).

Os PUFA's são subdivididos em grupos ou famílias, dependendo do estado de saturação das suas moléculas, sendo seus principais representantes os da família n-3 e n-6. Na família n-3, os principais ácidos graxos são o ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5 n-3), o ácido docosaexaenoico (DHA) (C22:6 n-3) e o ácido α -linolênico (ALA) (C18:3 n-3). As principais fontes de ALA são as sementes de oleaginosas como os óleos de canola (9,3g/100g) e soja (2,6g/100g) e a noz (6,8g/100g) e as principais fontes de EPA e DHA estão em vegetais e animais de origem marinha como o salmão (0,84 e 0,81g/100g), sardinha (0,47 e 0,51g/100g), caviar (1,03 e 1,35g/100g) e ostra (0,42 e 0,46g/100g) (Calder, 1998; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Garófolo e Petrilli, 2006).

O ácido linoleico (AL) é o representante mais importante da família n-6, sendo encontrado nos óleos vegetais como o de girassol, algodão, milho e soja, dando origem ao ácido araquidônico (AA) quando metabolizado, importante ácido graxo na geração de mediadores inflamatórios (via COX) como as prostaglandina E₂ (PGE₂) e fatores vaso dilatadores e de agregação plaquetária, prostaciclina I₂ (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), respectivamente, além da produção de leucotrienos série 4 (via LOX), cruciais no desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios (Leonard *et al.*, 2004). Já o EPA e DHA quando sofrem ação das mesmas enzimas (LOX e COX) geram diferentes produtos, desta vez com ação, em sua grande maioria, anti-inflamatória, como os prostanoides série 3 e leucotrienos série 5 (eicosanoides ímpares) como o PGE₃, LTA₅, LTB₅, LTC₅, LTD₅, antiagregatório (TXA₃) e vaso dilatador (PGI₃) (Figura 7) (Leonard *et al.*, 2004; Das, 2006; Le *et al.*, 2009; Wiktorowska-Owczarek *et al.*, 2015; Messamore *et al.*, 2017).

Figura 7. Metabolismo de PUFA's e vias de metabolismo. O diagrama mostra a possível biossíntese do DHA a partir do ácido α -linoleico (18:3n-3) bem como EPA (20:5n-3) e de ARA a partir do ácido linoleico (18:2n-6), havendo competição enzimática comum da delta-5 desaturases e elongases para a conversão desses ácidos graxos, que participam das vias COX/LOX e geram prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Messamore *et al.*, 2017).

A recomendação de consumo, considerado “adequado” de ALA é 1.6g/dia para homens (32 mg/kg considerando uma pessoa com peso corporal de 50kg) e 1.1g/dia para mulheres (22mg/kg). Porém, a recomendação diária de EPA/DHA mostra-se ainda muito variável (Tabela 1). A maior dose recomendada (FDA – *Food and Drug administration* – USA) é de não mais que 3g de EPA/DHA por dia, o que representaria 60mg/kg/dia considerando uma pessoa pesando 50kg.

Tabela 1. Recomendação para consumo diário de *n*-3

Fonte	Data	Recomendação diária	
		ALA	EPA + DHA
		<i>g</i>	<i>mg</i>
NATO workshop	1989	3	800
UK Committee on Medical Aspects of Food Policy	1994	—	100–200
ISSFAL workshop	1999	2.2	650
ANC (France)	2001	1.8	450 (DHA, 110–120)
Eurodiet	2000	2	200
Health Council of the Netherlands	2001	—	200
American Heart Association	2002	—	≈1 g/d
US National Academics of Science, Institute of Medicine	2002	1.4	≈140
European Society of Cardiology	2003	—	≈1 g/d
WHO FAO	2003	—	400–1000 (1–2 peixes/semana)
ISSFAL	2004	1.6	≥500
UK Scientific Advisory Committee on Nutrition	2004	—	Mínimo de 2 porções de peixe/semana (1 vegetal); considerar 450 mg
FDA	2004	—	Máximo de 3g/dia. Não mais que 2g por suplementação

Legenda: ANC - *Apports Nutritionnels Conseilles*; FAO - *Food and Agriculture Organization*; ISSFAL - *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*; NATO - *North Atlantic Treaty Organization*; WHO - *World Health Organization*; FDA - *U.S. Food and Drug administration*. Adaptado de Gebauer *et al.* (2006).

Atualmente, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente EPA e DHA, têm sido recomendado sendo seus benefícios sobre a memória e o sistema cardiovascular mundialmente conhecidos (**Davignus et al., 1997; Delgado-Lista et al., 2012; Vannice e Rasmussen, 2014**). O n-3 e n-6 constituem cerca de 30-35% do total de ácidos graxos cerebrais, sendo o DHA o ácido graxo mais abundante no cérebro humano, seguido do AA (**Youdim et al., 2000**).

Um dos possíveis destinos do ômega-3 ao ser absorvido no corpo seria a incorporação à membrana celular, que ao ser incorporado atuaria modulando diferentes sistemas celulares, tais como sinalização, expressão gênica e função estrutural das membranas (**Surette, 2008**). Um destes efeitos afetaria o controle da expressão do NF- κ B e fatores de transcrição, desta forma participando do processo de crescimento e atrofia celulares (**Magee et al., 2008**). Vários estudos têm demonstrado que a suplementação de EPA e n-3 é capaz de atenuar a atrofia muscular associada ao câncer, privação alimentar e septicemia, auxiliando na redução da atividade de componentes do SUP, estando relacionado com a modulação do via do NF- κ B (**Whitehouse et al., 2001; Smith et al., 2004; Tisdale, 2007; Khal e Tisdale, 2008**). Outra influência benéfica está relacionada com o menor ganho de peso e diminuição do acúmulo de tecido adiposo. **Sener et al. (2009)** observaram que ratos privados de ingestão de n-3 apresentaram maior ganho de peso que os animais que receberam o ácido graxo. No estudo de **Smith et al. (2004)** o grupo de camundongos que recebeu EPA isoladamente mostrou o menor peso corporal entre os grupos após 4 dias de uso de diferentes suplementos e **Cintra et al. (2012)** observaram que ratos obesos suplementados com n-3 apresentam menor ganho de peso. Tal efeito seria obtido em parte pela maior inibição de lipogênese hepática e da oxidação de ácidos graxos nos tecidos via PPAR α e AMPK (**Ruzickova et al., 2004; Kunesova et al., 2006; Kopecky et al., 2009; Kalupahana et al., 2011**).

Apesar dos efeitos benéficos do Ômega-3 apresentados por inúmeros estudos, seus benefícios ainda parecem controversos, sendo que alguns autores demonstram efeitos negativos da suplementação do Ômega-3 para o tecido muscular esquelético. Estudos mostraram que o ácido araquidônico teria a capacidade de induzir maiores níveis de síntese proteica, através da estimulação da produção de prostaglandina F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) no músculo esquelético, no entanto, o uso do EPA e DHA em modelo animal mostrou reduzir os níveis normais de PGF $_{2\alpha}$ em 49% e 46%, respectivamente, sendo isso explicado pela competição de precursores de n-3 por enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides, que reduz o nível de produção de prostaglandina F $_{2\alpha}$ (**Palmer e Wahle, 1987**).

Sohal *et al.* (1992) mostraram efeito similar com diminuição na produção de $\text{PGF2}\alpha$ em aproximadamente 75% após suplementação com compostos de Ômega-3, além de mostrarem taxa 20% menor de síntese proteica muscular, representando, segundo os autores, um possível impacto no crescimento e atrofia musculares.

Em um estudo recentemente realizado por nós, com o objetivo de avaliar o efeito do Ômega-3 no desenvolvimento da atrofia muscular induzida pelo dexametasona (**Fappi *et al.*, 2014**) os grupos de animais que tiveram associação da dexametasona (5mg/kg/dia) com o Ômega-3 (EPA/DHA), apresentaram níveis de ácido araquidônico (AA) reduzidos em comparação com o grupo CT (42,12%). Demonstramos ainda que a utilização prévia e concomitante de EPA/DHA associada ao dexametasona em ratos, conduziu a um maior prejuízo muscular que em comparação com a dexametasona de forma isolada, com maiores níveis de atrofia musculares em fibras do tipo 1 e 2A associado a uma maior expressão de atrogenes como *Atrogina-1* e diminuição na miogênese muscular, com diminuída expressão da *Miogenina* (*MYOG*). Foi demonstrado que essas alterações podem estar relacionadas, além da diminuição na quantidade de AA, com uma menor ativação de proteínas da via IGF-1/Akt/mTOR, como o Akt, no músculo esquelético. Entretanto, algumas limitações aconteceram em nosso estudo:

1) A análise de vias possivelmente influenciadas se restringiu a uma única via a via do IGF-1/Akt/mTOR; **2)** a dosagem estabelecida de dexametasona (5mg/kg/dia) pode ter trazido um impacto ao tecido muscular maior do que ômega-3 seria capaz de atuar; **3)** não foi feito um estudo da expressão de receptores de glicocorticoides uma vez que os PUFA's teriam a propriedade de aumentar a resposta dos receptores celulares e, por fim, **4)** o número de animais incluídos em nosso estudo foi limitado (N=6).

Justificativa

A ingestão de Ômega-3 (N-3) é mundialmente recomendada e de livre acesso da população, no entanto, seu uso prévio e concomitante com a dexametasona parece agravar a atrofia muscular induzida por esse tipo de medicamento (**Fappi *et al.*, 2014**). Entretanto, ainda não se elucidou quais os mecanismos envolvidos na influência do N-3 sobre esse modelo de atrofia. Sendo necessária a identificação de demais vias de sinalização e genes reguladores de trofismo. Portanto, determinar tais vias e seus mecanismos poderiam auxiliar na compreensão de possíveis efeitos colaterais resultantes da associação do N-3 com os glicocorticoides, como por exemplo a dexametasona.

Considerando que os glicocorticoides são anti-inflamatórios hormonais muito utilizados no tratamento de diversas situações médicas e que os ensaios experimentais têm avaliado diferentes mecanismos celulares de forma individual, além de dosagens divergentes, que variam de 0,4 à 80mg/kg/dia, julgamos importante determinar de que forma diferentes glicocorticoides usualmente prescritas na prática clínica, em doses equipotentes, influenciariam simultaneamente diferentes vias relacionadas com o trofismo muscular.

Dessa forma esperamos contribuir para uma melhor compreensão sobre o nível de ativação de cada mecanismo de atrofia muscular, permitindo, assim, identificar possíveis alvos terapêuticos.

OBJETIVOS E METODOLOGIA

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a ação de diferentes glicocorticoides, em dosagens equipotentes, administradas em diferentes dosagens, sobre vias reguladoras do trofismo muscular e determinar a influência do Ômega-3 sobre a atrofia induzida pela dexametasona.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ação do Ômega-3 associado ou não a dexametasona sobre: o peso corporal, área de secção transversa dos principais tipos de fibras musculares, expressão gênica de fatores de transcrição musculares, substratos de receptores (*IRS1/2*) e atrogenes (*Atrogina 1* e *MuRF-1*), expressão proteica de componentes das vias do IGF-1/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK, Miostatina/Smad2/3, sistema de degradação autofágico e receptores de glicocorticoides no músculo esquelético de ratos.
- Avaliar os efeitos do deflazacorte, metilprednisolona e dexametasona sobre: o peso corporal, área de secção transversa dos principais tipos de fibras musculares, expressão gênica de fatores de transcrição musculares, substrato de receptores (*IRS1/2*), e atrogenes (*Atrogina 1* e *MuRF-1*), expressão proteica de componentes das vias do IGF-1/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK e Miostatina/Smad2/3 no músculo esquelético de ratos.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais do estudo e Estruturação

Foram utilizados 100 animais *Wistar* machos, com idade entre 10 e 12 semanas, pesando entre 300 e 350 gramas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas que estabelecem os procedimentos para uso científico de animais no país (lei 11.794 de 8 de outubro de 2008) e após aprovação prévia do comitê de ética em pesquisa (CEUA – Comitê de ética para uso de animais) sob o protocolo 430/2013; sendo realizados no Laboratório de Investigação Médica 45 (LIM45) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos em gaiolas contendo no máximo três animais cada e mantidos em ciclo de 12:12 horas luz/escuro a 25°C, com acesso livre a água e ração padrão para roedores Nuvilab CR1-Nuvital, fornecida pela instituição. A ração fornecida é constituída de Proteína bruta (min) 22,0%, Extrato etéreo (min) 4,5%, Matéria mineral (máx.) 10,0%, Matéria fibrosa (máx.) 8,0%, Cálcio (máx.) 1,4%, Fósforo (min) 0,8%, enriquecida com vitaminas (valores/kg): Vitamina A 25.200,00 UI; vitamina D3 2.100,00 UI; vitamina E 60,00 mg; vitamina K3 12,50 mg; vitamina B1 14,40 mg; vitamina B2 11,00 mg; vitamina B6 12,00 mg; vitamina B12 60,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 112,00 mg; ácido fólico 6,00 mg, biotina 0,26 mg; colina 1.100,00 mg, Microelementos Minerais (valores/kg): Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg, aminoácidos: Lisina 100,00 mg e metionina 300,00 mg e aditivos: Antioxidante 100,00 mg (informação disponível em http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&id_serv=9).

O período experimental *in vivo* incluiu a administração da dexametasona, deflazacorte, metilprednisolona e Ômega-3 (N-3) aos animais, conforme apresentado na **Figura 8**, além da coleta de dados iniciais (peso corporal) e posteriormente coleta, pesagem e estocagem do material de estudo (músculos esqueléticos). O descarte de animais foi realizado conforme as normas técnicas estabelecidas pelo Centro de Bioterismo da FMUSP, disponível em: http://www2.fm.usp.br/gdc/docs/cep_5_grss_2_cartilha.pdf.

4.2. Suplementação com o Ômega-3 e associação com a dexametasona

Inicialmente, 30 animais foram suplementados com n-3 (extrato de ácidos graxos poli-insaturados EPA – DHA na proporção 50:10), marca Supra Ômega® (fabricante Global Nutrition, laudo de análise de conteúdo por cápsula disponível no **Anexo 1**), administrado via gavagem (v.g.) na dosagem de 100mg/Kg/dia de EPA, de segunda-feira a sábado, por

um período de 40 dias. Demais 30 animais receberam pela mesma via e quantidade solução veículo sem o Ômega-3, totalizando 60 animais. As cápsulas de Supra Ômega foram dissolvidas em água destilada com 0.5% de Tween-20 sob agitação contínua para realização da administração.

Após 30 dias de suplementação, 20 animais do grupo suplementado e 20 animais do grupo de solução veículo (v.g.) (40 animais) receberam dexametasona (DEXA) (Decadron injetável, 4mg/mL, laboratório Aché) por 10 dias, por via subcutânea (s.c.) precisamente às 13hs, nas dosagens de 2,5mg/kg/dia (10 animais suplementados e 10 animais solução veículo) e 1,25mg/kg/dia (10 animais suplementados e 10 animais solução veículo), sem suspender a suplementação com ômega-3. Os 20 animais restantes estabeleceram os grupos ômega-3 (N-3) e Controle (CT), sendo 10 animais suplementados com ômega-3 por 40 dias e 10 animais recebendo solução veículo (v.g.) por 40 dias em associação com solução salina subcutânea por 10 dias (**Figura 8**).

4.3. Indução da atrofia muscular e dosagens estabelecidas

A administração dos glicocorticoides e suas dosagens foram estabelecidas de acordo com a literatura, sendo utilizada uma dosagem considerada “alta” para cada tipo de glicocorticoide e uma dosagem com metade do valor determinando “meia” dosagem, em valores equipotentes à administração de dexametasona (**Meikle e Tyler, 1977; Nayak e Acharjya, 2008**). Quarenta (40) animais foram separados em quatro grupos com dez animais cada, estabelecendo os grupos de “tipo” e “dosagem” de glicocorticoide. Os animais foram mantidos nas condições normais sem administração de qualquer solução pelo período de 30 dias, após esse período, foram administrados os seguintes glicocorticoides por 10 dias nas seguintes dosagens e vias de acesso: **deflazacorte** (suspensão oral manufaturada em laboratório – Pharma Ramus laboratórios, Pinheiros - SP) “alta” dosagem (20 mg/Kg/dia) ou “meia” dosagem (10 mg/Kg/dia) administrado via gavagem e **metilprednisolona** (acetato de metilprednisolona, marca Depo-medrol®, solução injetável – Pfizer) “alta” dosagem (13,3 mg/kg/dia) ou “meia” dosagem (6,7 mg/kg/dia) via (i.m.) administrada intramuscular na região do isquiotibiais (alternando local e lado do corpo diariamente até completar os 10 dias de administração), totalizando 40 animais.

Ao final do período experimental que ocorreu entre 2014 e 2015 foram constituídos 10 grupos, entretanto não foi possível completar um N de 10 animais por grupo, devido a morte de alguns animais, quadro completo disponível na **Figura 8**:

1. **Grupo Controle (CT)** (Solução salina (v.g.) + solução salina (s.c.)).
2. **Grupo n-3** (Ômega-3 (v.g.) + Solução salina (s.c.));
3. **Grupo DX 2,5** (solução salina (v.g.) + Dexametasona 2,5mg/kg/dia (s.c.));
4. **Grupo DX 1,25** (solução salina (v.g.) + Dexametasona 1,25mg/kg/dia (s.c.));
5. **Grupo DX 2,5 + n-3** (Ômega-3 (v.g.) + Dexametasona 2,5mg/kg/dia (s.c.));
6. **Grupo DX 1,25 + n-3** (Ômega-3 (v.g.) + Dexametasona 1,25mg/kg/dia (s.c.));
7. **Grupo MP 13** (Metilprednisolona 13,3 mg/kg/dia (i.m.));
8. **Grupo MP 6** (Metilprednisolona 6,7 mg/kg/dia (i.m.));
9. **Grupo DC 20** (deflazacorte 20mg/kg/dia (v.g.));
10. **Grupo DC 10** (deflazacorte 10mg/kg/dia (v.g.));

Figura 8: Esquema representativo do desenho experimental realizado para a suplementação de n-3 e administração dos glicocorticoides em diferentes dosagens. Linha pontilhada indicação momento da associação da droga com o suplemento ou solução veículo. abreviação: dexta= dexametasona; sol. = solução; (v.g.) = via gavagem; (i.m.)= intramuscular.

4.4. Coleta dos materiais

Ao final do período de 40 dias, os animais foram pesados e eutanasiados (início por volta das 10:30hs) com a administração de Pentobarbital sódico (30mg/Kg) por via intraperitoneal, sendo os músculos gastrocnêmios (GA), tibiais anteriores (TA) e as glândulas adrenais coletados e pesados. Metade dos músculos TA e GA direitos foram montados coronalmente em fragmento de cortiça com *tissue tek* e congelada em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido para posterior análise histológica. Tendo, a porção distal dos mesmos músculos, bem como os músculos contralaterais, sido congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para extração de RNA total e proteínas.

4.5. Reações histológicas

Fragmentos dos músculos TA foram seccionados coronalmente em Criostato, marca Leica CM3000, de forma sequencial, a uma temperatura entre -23 e -30 °C, com secções de espessuras de 8 micrometros. As lâminas com os fragmentos musculares foram submetidas às colorações histológicas de hematoxilina e eosina (HE) para análise da posição do corte, sendo em seguida realizadas as seguintes técnicas.

4.5.1. Coloração metacromática de ATPase

Para avaliação e cálculo das áreas das fibras musculares de acordo com seus subtipos foi realizado o método metacromático de coloração de ATPase (mATPase), (**Ogilvie e Feedback, 1990**), que avalia o grau de inibição da atividade da ATPase miofibrilar, permitindo a distinção dos 3 principais tipos de fibras musculares (1, 2A e 2B). Resumidamente, as lâminas com os cortes musculares congelados são secas e incubadas em solução de pré-incubação contendo acetato de potássio (49mM) e cloreto de cálcio (23,4mM) diluídos em H₂O ultrapura (pH 4.5) por 2 min. em temperatura ambiente, sendo então realizado 3 lavagens de 2 minutos cada com Tampão de Tris contendo Trisma base (0.1M), cloreto de cálcio (23.4mM) diluídos em H₂O ultrapura, pH final 7.8. Em seguida as lâminas são incubadas em temperatura ambiente por 25 min. em tampão de incubação (cloreto de potássio (83mM), sal dissódico de ATP (4,59mM), cloreto de cálcio (0.18M), 1.5 M 2-amino-2methyl-1-propanol (11%) diluídos em H₂O ultrapura, pH final 9.4). As lamínas são então lavadas sequencialmente com mergulhos em três mudanças de cloreto de cálcio 1% em água ultrapura e, em seguida, coradas em solução com 1% de azul de toluidina aquosa por 10 seg., sendo imediatamente após lavadas em água destilada numa sequência de três béqueres para remover o excesso de corante. As lâminas passam então por desidratação em

bateria de álcoois (etanol 95% e absoluto), clareamento em xilol (5 min.) sendo então montadas para histologia com Entellan® (Merk Millipore). Após a realização da técnica, as fibras foram fotografadas a 20X em fotomicroscópio marca Olympus AX70 (Olympus Melville, NY, USA). O cálculo da área de secção transversa das fibras foi realizado por meio do programa *Photoshop CS6 extended* para *Windows* com ajuste de escala 691 pixels em 100 μm . Após configuração inicial do *software*, as fibras musculares, selecionadas por subtipos, tiveram o sarcolema tracejado em posição coronal para o cálculo da área transversa, disponível em μm^2 . Foram mensuradas entre 600 e 800 fibras musculares por lâmina do fragmento muscular de cada animal, sendo calculada a média das áreas obtidas de acordo com a classificação das fibras, em tipos 1, 2A e 2B.

4.5.2. Imuno-histoquímica e imunofluorescência

Para marcação e avaliação qualitativa da expressão dos receptores de glicocorticoides no tecido muscular, cortes com espessura entre 8 – 12 μm foram submetidos à imunomarcação pela técnica (ABC) por avidina biotina e imunofluorescência. Resumidamente, as lâminas contendo secções musculares são mantidas por 10 minutos em ar ambiente, os cortes isolados com caneta hidrofóbica, fixados em acetona a -20°C por 10 minutos e lavados em PBS (*phosphate buffer solution*) pH 7.4, 3 vezes por 10 min. Cada lavagem, seguido de lavagens em PBS entre as etapas seguintes. A peroxidase endógena é eliminada com incubação das lâminas em solução de 0,1% de H_2O_2 em PBS por 30 min., seguida pela incubação em solução de bloqueio (0,1% BSA; 10% soro normal *Goat*; 0,5% *Tween* em PBS por 30 minutos). O anticorpo primário para marcação de receptor de glicocorticoide total (tGR) (**anti-Glucocorticoid Receptor Clone: BuGR2 Monoclonal Antibody, Thermo Scientific, #MA1-510**) e fosforilado (**anti-phospho receptor GC (ser211), Bioss cód. #BS-3168R**) diluído em solução de bloqueio é incubado *overnight* a 4°C , seguido de incubação por 1h em anticorpo secundário biotinilado (anti-coelho ou anti-camundongo) ou fluorescente (anti-coelho Alexafluor 594 -vermelho (P-GR) ou anti-camundongo FITC – verde (Colágeno IV) e DAPI (azul) para marcação nuclear. Para o método ABC procedeu-se incubando as lâminas por 45 min. em solução com 0,02% de ABC (*avidin-biotin complex*) em PBS, as lâminas sendo então expostas ao cromógeno diaminobenzidina (DAB) em solução de 0,00003% de DAB (9 mg) com 0,05% de H_2O_2 em PBS por 2 min., sendo contra-coradas após com hematoxilina. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em bateria de álcoois com concentração ascendente (70 – 100%), lavadas

em xileno e montadas com Entellan (Merck, #107960). As lâminas foram examinadas e fotografadas no microscópio Olympus AX70 para comparação e descrição qualitativa.

4.6. Eletroforese SDS-PAGE (*Western blotting*)

Fragmentos do músculo GA de cada animal foram homogeneizadas em homogeneizador *Potter* em 10-20 X seu peso em volume utilizando tampão de lise RIPA (0,5% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P40 em solução de PBS pH7,4) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich; #P5726 e #A-1153, respectivamente), seguido de centrifugação a 13.000g por 5 min. à 4°C, sendo o sobrenadante reservado para uso. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina na realização de curva de diluição padrão. Quantidades iguais de proteínas (80 – 100 µg por amostra) foram acrescidas de tampão de eletroforese e DTT 0.1M, fervidas a 95°C por 5 min. e mantidas no gelo por 5 min., sendo então aplicadas em gel SDS-PAGE (8-10% de bis-acrilamida) e submetidas à eletroforese com voltagem de 100 a 120V, por 1-2 horas, em aparato de eletroforese marca BioRad. As proteínas são então transferidas para membrana de PVDF ou Nitrocelulose (voltagem de 100V por 1-2hs) e posteriormente incubadas em tampão de bloqueio TBS-T (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.1% Tween 20), contendo 5% de leite desnatado (Blotto Rockland, #B501-0500) por 1 hora em temperatura ambiente para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas em tampão de bloqueio contendo o anticorpo primário (**Tabela 2**) por aproximadamente 20 horas em agitação leve e temperatura de 4° C. Após três lavagens de 10 min. com TBS-T, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio contendo anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*horseradish peroxidase conjugated*) por 1 - 2h em temperatura ambiente. Após nova lavagem com TBS-T (3 vezes de 10 min. cada), a membrana foi incubada em reagente quimiluminescente (*Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*, marca Merck-Millipore) por 5min. em agitação manual e em seguida foi realizado escaneamento em digitalizador quimiluminescente (C-DIGI – LICOR Biosciences, U.S.A.) conforme instruções do fabricante.

Com o objetivo de normatizar a quantidade de proteínas do tecido muscular aplicadas ao gel e determinar os valores de *blot* obtidos foi realizada a razão da proteína alvo com normalizador em cada amostra utilizou-se como controle a proteína total das membranas coradas com corante *comassie blue* e escaneadas (**Figura 9**).

Figura 9. Membranas de *Western blotting* corada para controle de proteína total, no exemplo acima, membranas usadas na análise do P-EKR e à direita na análise do P-Smad.

Os anticorpos primários utilizados em todo o estudo estão apresentados na **tabela 2**. Para análise densitométrica das bandas de proteínas marcadas nas membranas foi utilizado o software *Image Studio Digits ver. 5.2* (LI-COR Biosciences).

Tabela 2. Anticorpos utilizados no estudo.

<i>Antígeno</i>	<i>Empresa/ código</i>	<i>Hospedeiro</i>
Akt pan	Cell Signaling / 4691	Coelho
P-Akt (Ser473)	Cell Signaling / 4060	Coelho
GSK3β	Cell Signaling / 9315	Coelho
P-GSK3β (Ser9)	Cell Signaling / 9322	Coelho
FOXO3a	Cell Signaling / 2497	Coelho
P-FOXO3a (Ser253)	Cell Signaling / 9466	Coelho
ERK1/2	Cell Signaling/ 4695	Coelho
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling/ 4377	Coelho
Smad2/3	Cell Signaling/ 3102	Cabra
P-Smad2/3 (Ser423/425)	Cell Signaling/ 8828	Cabra
Total GR	Thermo Scientific/ MA1-510	Camundongo
P-GR (Ser211)	Bioss Inc/ bs-3168R	Coelho
Col IV	Hybridoma bank/ M3F7	Camundongo
LC3I/II	Sigma Aldrich/ L7543	Coelho
P-62/SQSTM1	Sigma Aldrich/ P0068	Coelho

4.7. Reação de transcriptase reversa

O RNA total dos fragmentos musculares de GA foi extraído usando kit de extração comercial *SV Total RNA Isolation System*, Promega (cód Z3105) seguindo as instruções do kit disponível em <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>. A extração foi realizada em nitrogênio líquido e gral com pistilo, seguido de agitação com rotor de pistilo e incubação em gelo por 20 min. Utilizou-se 30mg de amostra de GA para 175 μ l de tampão de extração.

A integridade e a quantidade de RNA de cada amostra foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose e por medida espectrofotométrica em absorbâncias a 260:280

nm, na qual amostras com razão $A_{260}:A_{280}$ menor são 1,8 descartadas, entretanto, todas as amostras tiveram razão $A_{260}:A_{280}$ próximos de 2.0 e, portanto, nenhuma amostra foi descartada. O RNA foi quantificado com o equipamento espectrofotômetro NanoDrop 1000, tendo média de 450 ng/ μ l de RNA após extração.

O RNA foi tratado com DNase I (Promega cód Z358A) durante o processo de extração com o kit de isolamento de RNA total. Para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizou-se o kit comercial Promega *GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers* (Cód A2801), seguindo instruções do kit, foi utilizado 0,5 μ g (500ng) de RNA por amostra em um volume final de RNA, H₂O *nuclease-free, random primer* e enzima de 20 μ l, sendo, em seguida, levadas ao termociclador Eppendorf (Vapo-protect mastercycler pro, Eppendorf, Alemanha) para realização da transcrição reversa em ciclagem pré-determinada sendo imediatamente após mantidas em – 20 °C até o uso.

4.8. PCR em tempo real

Reação de PCR em tempo real foi realizada para estudar a expressão dos genes *IRS-1*, *IRS-2*, *MyoD*, *Miostatina*, *Miogenina*, *REDD-1* e *REDD-2* e *Atrogina-1/MAFbx* e *MuRF1* nos músculos GA dos animais. Para amplificação por PCR foi efetuada utilizando-se 37,5 ng de cDNA adicionado à GoTaq® qPCR Master Mix, 2X (kit Promega A6002) acrescidos de *primers* (senso e antissenso), em placas de 96 poços *Thermo Scientific* (cód SPL0961). O volume de solução final utilizada foi de 16 μ L em duplicata, analisadas no equipamento *Piko Real 96* (Thermo Scientific). As condições da PCR em tempo real incluem desnaturação inicial à 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e 1 minuto entre a 60 °C para pareamento e extensão. Os dados referentes aos mRNA do estudo foram normalizados pela razão dos valores referentes ao GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) da mesma amostra e comparados entre si por normalização logarítmica ($2^{-\Delta\Delta CT}$). As sequências de oligonucleotídeos utilizados no estudo estão apresentadas na **tabela 3**.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos usados no estudo.

Gene	Forward	Reverse	Referência
<i>IRS-1</i>	CCCGGTCGGTGCCAAATAGC	GCCACTGGTGAGGTATCCACATAG C	(Guo <i>et al.</i> , 2006)
<i>IRS-2</i>	CCACACACCTGTCTCATTG	TAATCCGCTTTGCCAAAATC	(Li <i>et al.</i> , 2013)
<i>Miogenina</i>	CACATCTGTTCGACTCTCTTCC	ACCTTGGTCAGATGACAGCTTTA	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
<i>Miostatina</i>	CCATGCCTACAGAGTCTGAC	CTTCTAAAAAGGGATTGAGCC	(Moore <i>et al.</i> , 2008)
<i>MURF-1</i>	TCGACATCTACAAGCAGGAA	CTGTCCTTGAAGATGCTTT	(Pires-Oliveira <i>et al.</i> , 2010)
<i>Atrogina-1</i>	TGAAGACCGGCTACTGTGGAAGAG AC	TTGGGGTGAAAGTGAGACGGAGC AG	(Pires-Oliveira <i>et al.</i> , 2010)
<i>REDD-1</i>	CACCGGCTTCAGAGTCATCA	CGGGTCTCCACCACAGAAAT	(Murakami <i>et al.</i> , 2011)
<i>REDD-2</i>	CTTCAGCGTCTGGTGAAATCC	ATGCTGGCCGTGTTCTTACTG	(Murakami <i>et al.</i> , 2011)
<i>MyoD</i>	TGTAACAACCATACCCCACTCTC	AGATTTTGTGCACTACACAGCA	(Dasarathy <i>et al.</i> , 2004)
<i>GAPDH</i>	ACGCCAGTAGACTCCACGAC	ATGACTCTACCCACGGCAAG	(Janjoppi <i>et al.</i> , 2008)

4.9. Cromatografia gasosa

Para análise do perfil de ácidos graxos totais e PUFA no tecido muscular dos animais foi realizada cromatografia gasosa no Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos Funcionais no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental do campus de Farmácia da Universidade de São Paulo (FCF-USP). A extração foi realizada pela técnica de **Bligh & Dyer** (1959) de acordo com **Iverson *et al.*** (2001) (**Bligh e Dyer, 1959; Iverson *et al.*, 2001**). Resumidamente, 150mg de amostras dos músculos GA foram homogeneizadas com Ultraturrax (modelo IKA T10 Basic) com uma mistura contendo clorofórmio (125 µL) e metanol (200 µL). A solução foi novamente homogeneizada com clorofórmio/metanol em solução salina de (0,88% NaCL) sendo a emulsão final centrifugada à 13.000g por 5 min. à 25 °C. A fase superior dos tubos centrifugados foi removida e a fase inferior evaporada sob vapor de nitrogênio. As amostras de gordura foram então derivadas usando a técnica de esterificação como descrita por **Shirai *et al.*** (2005) e suas composições determinadas em cromatógrafo à gás (Agilent 7890 A GC System, Agilent technologies Inc., Santa Clara, USA) (**Shirai *et al.*, 2005**). Foi utilizada coluna capilar fundida de sílica (J&W DB-23 Agilent 122-236; 60m x 250 mm de diâmetro interno) para injeção das amostras. Hélio de alta pureza foi aplicado em fluxo de 1ml/min. com injeção de separação de 50:1. A programação de temperatura da coluna foi: inicial a 80 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min até 175 °C seguido de outro

gradiente de 3 °C/min. para 230 °C, sendo mantido nesta temperatura por 5 min. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C e 280 °C, respectivamente. Os ácidos graxos foram identificados por comparação do tempo de retenção comparados com quatro misturas purificadas de padrões de retenção de ácidos graxos metil ésteres (Sigma Chemical Co.: 4-7801; 47085-U; 49453-U e 47885-U). Os resultados são expressos em % de ácidos graxos totais (mg/100mg).

4.10. Análise estatística

Todos os dados obtidos passam inicialmente por teste de distribuição de dados de *Shapiro-Wilk* sendo em seguida analisados através de métodos estatísticos correspondentes ao tipo de distribuição. Para comparação dentre os grupos de amostras foi feita análise de variância (ANOVA) de uma via ou com medidas repetidas em caso de variáveis dependentes seguido de seus pós-teste correspondente, para comparação entre dois grupos de amostras foi realizado teste T de *Student* ou Mann-Whitney dependendo da distribuição de dados, sendo os testes utilizados descritos no momento da apresentação de cada resultado. Foram consideradas variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultar em um *P* menor igual a 0,05. Os resultados estão apresentados como medida de tendência central em média aritmética $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Graph Pad Prism*, versão 5.00 de 2007, para *Windows* (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS DO ESTUDO

5. RESULTADOS

SESSÃO 1: ANÁLISE DA INTERAÇÃO DO ÔMEGA-3 COM A DEXAMETASONA

5.1. Massa corporal

A média de peso inicial dos animais variou entre 325 e 339g entre grupos, sendo o ganho de peso corporal linear no decorrer dos 30 dias iniciais do estudo (administração de ômega-3 via gavagem) e proporcional ao crescimento natural dos animais, mostrando variações (perda) de peso significativas apenas após dois dias de administração de dexametasona (**Figura10, Tabela 4**).

Figura 10. Variação de massa corporal durante os 40 dias de experimentação. Linha pontilhada representa momento de início da administração de dexametasona.

A média de peso inicial do grupo CT (controle; N=10), foi de 325,5g e sua média de peso final de 447,9g, representando um ganho de 37,60% de peso corporal ao fim de 40 dias.

O grupo N-3 (ômega-3; N=10) apresentou média de peso inicial de 337,5g e média de peso final de 441,67g, com ganho de 30,86% de peso em 40 dias.

O grupo DX 1,25 (N= 9), apresentou média de peso inicial de 339,4g e de 433,9g ao início da administração de dexametasona. A média de peso final foi de 336,7g, representando

uma perda de 22,40% de peso após 10 dias de dexametasona a 1,25 mg/kg/dia e de 24,82% em comparação ao peso final do grupo CT ($P<0.001$).

Tabela 4. Média de massa corporal no decorrer do estudo.

Grupos	Dias de estudo						
	1	30	32	34	36	38	40
CT	325,5g	424,9g	433,4g	434,0g	438,2g	444,8g	447,9g
N-3	337,5g	406,4g	424,8g	418,7g	424,7g	429,9g	441,7g
DX 2.5	328,1g	443,3g	422,9g	398,0g	374,6g ***	357,1g ***	335,5g***
DX 1.25	339,4g	433,9g	414,1g	390,4g *	367,4g ***	348,0g ***	336,7g***
DX 2.5 + N-3	327,2g	442,2g	427,6g	397,6g	373,0g ***	356,2g ***	336,6g***
DX 1.25 + N-3	332,5g	414,6g	405,9g	376,4g **	355,0g ***	330,0g ***	324,4g***

Asteriscos representam resultado estatístico da comparação ao grupo CT em cada momento de administração da DEXA. * = $P<0,05$; **= $P<0,01$ e ***= $P<0,001$. Teste estatístico: Anova com medidas repetidas com pós teste de Bonferroni.

O grupo DX 1,25 +n-3 (N= 8), apresentou média de peso inicial de 332,5g e de 414,6g no início da administração de dexametasona. A média de peso final foi de 324,4g, representando uma perda de 21,76% de peso após 10 dias de dexametasona 1,25mg/kg/dia associado ao ômega-3 e de 25,57% em comparação ao grupo CT ($p<0.001$).

O grupo DX 2,5 (N= 8) apresentou média de peso inicial de 328,1g e de 443,3g no início da administração de dexametasona. A média de peso final foi de 335,5g, representando perda de peso corporal de 24,31% após 10 dias de dexametasona a 2,5 mg/kg/dia e de 24,09% em comparação ao peso final do grupo CT ($P<0.001$).

O grupo DX 2,5+N-3 (N= 9) apresentou média de peso inicial de 327.2g e de 442.2g no momento de início da dexametasona. A média de peso final foi de 336,6g, representando perda de 23,89% de peso após 10 dias de dexametasona a 2,5 mg/kg/dia associado ao ômega-3 e de 24,85% em comparação ao peso final do grupo CT ($P<0.001$), sem diferenças em relação ao grupo somente DX 2,5.

Dessa forma é possível observar que a administração de dexametasona (DEXA) impacta significativamente no ganho de massa corporal não tendo a suplementação de N-3 de modo isolado ou em associação com a afetado a DEXA afetado esse resultado.

5.2. Peso da glândula adrenal

Com o objetivo de avaliar os efeitos da DEXA e do N-3 sobre o eixo hipotalâmico/pituitária/adrenal (HPA) avaliamos o peso da glândula adrenal após os 10 dias de administração da droga. A coleta das glândulas adrenais e suas respectivas pesagens mostraram que a administração de dexametasona em diferentes dosagens acarretaram

significante perda de peso da adrenal (**Figura 11**), ocorrendo de forma significativa nos grupos DX 1,25 (-68,83%), DX 2,5 (-66,91%), DX 1,25+N-3 (-64,34%) e DX 2,5+N-3 (-60,90%) em comparação ao grupo CT.

O uso isolado de N-3 causou diminuição de 19,04% no peso da glândula adrenal, não sendo considerada significativa em comparação ao grupo CT, e sua concomitância com a DEXA não agravou a atrofia observada.

Figura 11. Peso da glândula adrenal de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico da comparação da média de peso da glândula adrenal dos grupos de intervenção em relação ao grupo CT. **= $P<0,01$ e ***= $P<0,001$. Teste estatístico: Anova de uma via.

5.3. Peso muscular

A análise do peso dos músculos coletados (GA e TA), que traduz diretamente o impacto da administração de glicocorticoides sobre a musculatura esquelética, demonstrou que ambas as dosagens de dexametasona estabelecidas foram suficientes para acarretar perda de peso significativa dos músculos GA e TA em cerca de 30% em comparação ao grupo CT (**Figura 12**). O uso concomitante de N-3 com dexametasona não influenciou o peso muscular de nenhum dos músculos coletados além do ocasionado pelo uso isolado de dexametasona.

Figura 12. Peso dos músculos gastrocnêmio (GA) e tibial anterior (TA) de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos

representam resultado estatístico em comparação com o grupo CT. ***= $P<0,001$. Teste: Anova de uma via seguido de pós teste de Bonferroni.

5.4. Cálculo da área de secção transversa das fibras musculares

A análise de área das fibras dos músculos TA dos animais, que visou demonstrar o tipo de fibra mais afetada após a administração de dexametasona em associação ou não com N-3 (**Figura 13 e 14**) mostrou que a dexametasona de forma isolada (grupos DX 2,5 e 1,25) ou em associação com o ômega-3 (grupos DX 2,5+N-3 e DX 1,25+n-3) causou atrofia significativa em fibras do tipo 2B em comparação ao grupo CT ($P<0,001$ para todos), com as seguintes porcentagens de diminuição: grupo DX 2,5 = 44,92%; DX 1,25 = 41,63%; DX 2,5+N-3 = 41,46% e DX 1,25+N-3 = 45,58% em comparação ao grupo CT.

Em fibras do tipo 2A apenas grupos de associação de dexametasona com ômega-3 mostraram atrofia significativa em comparação ao CT. A diminuição de área no grupo DX 2,5+N-3 foi de 21,76% ($P<0,05$) e no grupo DX 1,25+N-3 de 27,15% ($P<0,01$) em comparação ao grupo CT. Houve diferença significativa entre os grupos DX1,25 e DX1,25+N-3 ($P<0,05$).

Em fibras do tipo 1 todos os grupos, exceto o grupo DX2,5, apresentaram atrofia significativa em comparação ao grupo CT, incluindo animais do grupo N-3. A atrofia em animais do grupo DX 2,5+N-3 foi superior a área observada em animais DX 2,5 ($P<0,05$). A diminuição na área da fibra tipo 1 foi de 23,65% no grupo N-3 ($P<0,05$), de 20,54% em animais DX 2,5, de 34,52% no grupo DX 2,5+N-3 ($P<0,05$), de 30,95% no grupo DX 1,25 ($P<0,01$) e de 36,90% no grupo DX 1,25+ n-3 ($P<0,01$) em comparação ao grupo CT.

Figura 13. Área de secção transversa das fibras musculares de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico em comparação ao grupo CT (Anova de uma via) por tipo de fibra. Sustenidos resultados da comparação entre 2 grupos (teste T de Student). * ou # = $P<0,05$; **= $P<0,01$ e ***= $P<0,001$.

Figura 14. Coloração metacromática de ATPase para diferenciação de fibras musculares e cálculo de área de secção transversa de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Ampliação da foto = 20x. Barra de escala = 100µm. Legenda: Seta = fibra tipo 1; cabeça de seta = fibra 2A; asterisco = fibra 2B.

5.5. Proporção de fibras musculares

De modo a avaliar se a diminuição na área das fibras seria acompanhada de alterações na proporção de fibras nos grupos de estudo, foi feita uma análise na proporção de fibras 1, 2A e 2B de 5 animais por grupo (contando 500 fibras por animal e calculando a porcentagem de tipo de fibras do total avaliado) (**Figura 15, Tabela 5**).

Observou-se que a proporção de fibras 1 foi significativamente diminuída no grupo DX1,25+N-3 ($P<0,05$) com uma tendência a diminuição no grupo N-3 ($P=0,08$) em

comparação ao grupo CT. Observou-se, ainda, diminuição significativa na proporção de fibras 1 entre os grupos DX1,25 e DX1,25+N-3 ($P<0,05$).

Em fibras 2A observou-se diminuição significativa na proporção de fibra nos grupos N-3 ($P<0,01$), DX1,25 ($P<0,05$) e aumento no grupo DX2,5 ($P<0,01$). Da mesma forma houve diferença significativa na proporção de fibras 2A entre os grupos DX2,5 e DX 2,5+N-3 ($P<0,01$) e entre os grupos DX1,25 e DX1,25+N-3 ($P<0,05$). Em fibras 2B observou-se que os grupos N-3 e DX1,25+N3 aumentaram significativamente a quantidade desse tipo de fibra em comparação ao grupo CT ($P<0,01$ para ambos). O mesmo foi observado comparando os grupos DX1,25+N-3 em relação ao grupo DX1,25 ($P<0,01$).

Figura 15. Proporção de fibras musculares 1, 2A e 2B no músculo TA de ratos submetidos a administração de DEXA com ou sem a suplementação prévia de N-3 por 40 dias.

Tabela 5. Contagem de proporção de fibra 1, 2A e 2B entre os grupos recebendo DEXA com ou sem a suplementação prévia de N-3 em ratos. Teste estatístico: *Mann-Whitney* para comparação entre grupos.

Proporção de Fibras (músculo TA)						
	Fibra 1	valor de P	Fibra 2A	valor de P	Fibra 2B	valor de P
CT	<u>12,83%</u>	$P=0,08$ vs N-3 $P=0,0043^{**}$ vs DX1,25+N-3	<u>27,17%</u>	$P=0,0087^{**}$ vs N-3 $P=0,0260^*$ vs DX1,25+N-3 $P=0,0023^{**}$ vs DX2,5	<u>60,00%</u>	$P=0,0022^{**}$ vs N-3 $P=0,0043^{**}$ vs DX1,25+N-3
N-3	<u>5,77%</u>	-	<u>17,79%</u>	-	<u>76,44%</u>	-
DX1,25	<u>12,18%</u>	-	<u>26,50%</u>	$P=0,0006^{***}$ vs DX2,5	<u>61,32%</u>	-
DX1,25+N-3	<u>2,90%</u>	$P=0,0152^*$ vs DX1,25	<u>20,57%</u>	$P=0,0411^*$ vs DX1,25	<u>76,53%</u>	$P=0,0043^{**}$ vs DX1,25
DX2,5	<u>10,52%</u>	-	<u>34,56%</u>	-	<u>54,92%</u>	-
DX2,5+N-3	<u>9,63%</u>	-	<u>25,38%</u>	$P=0,0087^{**}$ vs DX2,5	<u>64,99%</u>	-

5.6. Receptor de glicocorticoide (imuno-histoquímica)

De forma a saber se a suplementação de N-3 prévia e em concomitância com o DEXA causaria alterações na sinalização/expressão de receptores na membrana ou intracelular, fizemos a avaliação da expressão de receptor de glicocorticoide (GR).

Inicialmente, de forma qualitativa, lâminas com cortes de TA foram incubados (*overnight*) ao anticorpo para total de receptores de glicocorticoide (tGR) (**Figura 16**) como descrito previamente na metodologia. Como resultado observamos revelou um padrão de marcação sarcoplasmática em maior quantidade e intensidade em animais pertencentes à grupos que receberam dexametasona em comparação ao grupo CT, com uma marcação intermediária (muito similar ao grupo CT) em animais que receberam apenas N-3.

Figura 16: Expressão de receptor total de glicocorticoide (tGR) na fibra muscular de tibial anterior de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Barra de escala = 100 μ m.

Já a forma fosforilada do receptor (P-GR – Ser211) (**Figura 17**), mostrou marcações nucleares e/ou circunjacentes aos núcleos da fibra muscular (setas) de forma mais intensa e em maior número em animais que receberam dexametasona em relação ao grupo CT. A

quantidade/intensidade de manchas “spots” mostrou-se proporcional à dosagem de dexametasona, com maior marcação em maiores dosagens.

Figura 17: Marcação de receptor de glicocorticoide fosforilado (P-GR) na fibra muscular de tibial anterior de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Barra de escala = 100 μ m. Seta = marcação nuclear.

5.7. Imunofluorescência de P-GR (Ser211)

De forma melhor avaliar a distribuição dos *spots* considerando fibras de contração lenta ou rápida, foi feita incubação do anticorpo anti-P-GR (Ser211) e anti-COL-IV que evidencia fibras de contração lenta e intermediárias (em verde) (**Figura 18**).

De maneira similar ao observado na imuno-histoquímica houve um aumento da marcação do receptor (P-GR) nos grupos recebendo dexametasona em relação ao grupo CT com bem delimitada marcação nuclear (entre fibras) de forma mais dissipada na associação entre ômega-3 e dexametasona em ambas as dosagens. Observou-se também que a administração de glicocorticoides mostra padrões de acúmulo de receptor preferencialmente em fibras do tipo 2B, com exceção do grupo DX1,25 que apresentou maior quantidade de marcações em fibras 1.

Imunofluorescência para GRr

Figura 18. Imunofluorescência para marcação do receptor de glicocorticoide fosforilado (P-GR Ser211) de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias.

5.8. Análise quantitativa do GR

De forma a determinar se houve alterações na expressão do receptor de glicocorticoide total e fosforilado foi realizada a técnica de *Western blotting* utilizando os mesmos anticorpos previamente utilizados (**Figura 19**).

Observou-se um aumento na expressão em tGR no grupo DX2,5+n3 em comparação aos grupos CT e DX2,5 ($P<0,05$ para ambos). Não tendo havido alterações significativas nos demais grupos.

A expressão de P-GR (Ser211) foi significativamente aumentada nos grupos DX1,25, DX2,5 e DX2,5+n3 em comparação ao grupo CT ($P<0,05$ em relação ao grupo DX2,5+N-3 e DX1,25 e $P<0,001$ em relação ao grupo DX2,5). Os grupos DX2,5+n3 apresentou menor expressão de P-GR em relação ao grupo DX2,5 ($P=0,08$).

Figura 19: Expressão de receptor de glicocorticoide nas formas total (tGR) e fosforilada (P-GR – Ser211) no tecido muscular (TA) de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. *Asteriscos representam comparação estatística como o grupo CT; # sustentado comparação entre dois grupos. * ou # = $P<0,05$; *** = $P<0,001$. Teste estatístico: Teste t de *Student* para comparação entre grupos.

5.9. Western blotting

5.9.1. Via IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR

A avaliação proteica para as proteínas que integram as vias de sinalização proposta no estudo (IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR; Miostatina/Smad3/2 e Ras/Raf/MEK/ERK) foi iniciada por uma das vias, a via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR (**Figura 20**).

A avaliação do AKT, uma das mais importantes proteínas da via do IGF-1, em animais recebendo dexametasona associado ou não com N3 mostrou significativa

diminuição na expressão de Akt total em todos os grupos em comparação ao grupo CT ($P<0,01$), exceto grupo N-3, não foi observada diferenças entre grupos de intervenção.

A expressão da forma fosforilada do Akt (P-Akt - Ser473) mostrou-se significativamente diminuída em animais dos grupos DX1,25, DX1,25+N3 ($P<0,05$ para ambos) com tendência a diminuição no grupo DX2,5 ($P=0,07$) em relação ao grupo CT.

A expressão de GSK3 β total mostrou-se significativamente aumentada nos grupos DX1,25+N3 e DX2,5 em relação ao grupo CT ($P<0,05$ para ambos). A expressão da forma fosforilada de GSK3 β (P-GSK3 β , Ser9) mostrou-se significativamente diminuída nos animais dos grupos DX1,25, DX1,25+N3 e DX2,5 em relação ao grupo CT.

Figura 20. Expressão de AKT e GSK3 β total e fosforilada no músculo TA de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos em relação ao CT. * = $P<0,05$; ** = $P<0,01$. Teste estatístico: Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

A avaliação do FoxO3a, fator de transcrição envolvido com a transcrição de enzimas ligadoras do SUP (Atrogina-1/MAFbx e MuRF-1), mostrou que a administração de dexametasona induziu a um aumento significativo na expressão de FoxO3a total somente em animais recebendo associação de dexametasona com ômega-3 (grupos DX1,25+N3 e DX2,5+N3) em relação ao CT e em comparação aos grupos de não associação, grupos DX1,25 e 2,5. Observou-se uma diminuição significativa na expressão de P-FoxO3a (Ser253) em todos os grupos em comparação ao grupo CT, não havendo diferença entre grupos. A razão de P-FoxO3a por FoxO3a total mostrou ter havido diminuição significativa na fosforilação do FoxO3a nos grupos DX1,25, DX2,5 e DX2,5+N3, e uma tendência à diminuição no grupo N3 (**Figura 21**).

Figura 21. Expressão de FoxO3a total e fosforilado (Ser253) de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos em relação ao CT. Sustenidos comparação entre 2 grupos. # ou * = $P < 0,05$; ** ou ## = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Teste estatístico: *Teste t* para comparação entre grupos.

5.9.2. PPARGR-1alfa (PGC1 α)

Baseado na informação prévia de autores (Sandri *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010), a expressão de PGC1 α em fibras do tipo 1 e 2A está relacionado com a “proteção” da fibra contra a ação dos FoxO’s e da atrofia induzida por glicocorticoides e uma vez que observamos uma maior atrofia em fibras 1 e 2A após a associação de N-3 com DEXA em nosso estudo, decidimos por avaliar (por *Western blotting*) usando anticorpo Anti-PGC1 α (Abcam, cód. #ab54481), a expressão de PGC1 α no músculo TA dos animais (Figura 22).

De acordo com nossas análises a expressão de PGC1 α foi diminuída nos grupos N-3, DX1,25 e DX1,25+N3 em comparação ao grupo CT ($P>0.05$ para todos), com tendência a diminuição no grupo DX2,5+N3 ($P=0,07$), entretanto, sem afetar a expressão no grupo DX2,5. Comparando de forma isolada, houve diminuição significativa na expressão de PGC1 α no grupo DX1,25 e DX2,5+N3 em relação ao grupo DX2,5 ($P<0,05$ para ambos).

Figura 22. Expressão de PGC1 α no músculo TA de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico de comparação em relação ao CT. Sustenidos comparação entre 2 grupos. # ou * = $P<0,05$. Teste estatístico: Anova de uma via para comparação múltipla e teste t de *Student* para comparação entre grupos.

Sabendo que a expressão de PGC1 α (representada na Figura 21), por *Western Blotting* se refere a uma expressão provinda de um *pool* total de proteínas após extração, não sendo possível avaliar quantitativamente sua expressão em fibras 1 e 2A, optamos por realizar uma avaliação de PGC1 α por imuno-histoquímica utilizando o mesmo anticorpo primário, dessa forma sendo possível avaliar em que tipo de fibra se daria a marcação a partir de uma secção transversa (corte sequencial) por mATPase.

Inicialmente, a partir de um mesmo fragmento muscular, realizamos duas técnicas em 2 lâminas com o mesmo corte (sequencial), uma com a técnica de mATPase que diferencia os três principais tipos de fibra (1, 2A e 2B) e a outra com a técnica de imuno-histoquímica (método ABC) utilizando o mesmo anticorpo utilizado na técnica de Western blotting, foi possível identificar em que tipo de fibra (comparando à mATPase) se dá a marcação do PGC1 α (**Figura 23**).

Observamos após as duas técnicas que a marcação do PGC1 α se dá preferencialmente em fibras do tipo 2A > 1, não possuindo marcação em fibras do tipo 2B.

Figura 23. mATPase e marcação por imuno-histoquímica de PGC1 α em corte sequencial mostrando mesma área da fibra. Barra de escala 100 μ m.

Uma vez determinado o tipo de fibra em que se dá a marcação, e sabendo que a expressão vista no *Western Blotting* se trata da expressão em fibras 1 e 2A, seguiu-se com a imuno-histoquímica qualitativa em todos os grupos (**Figura 24**).

A partir das fotos obtidas das lâminas após a imuno-histoquímica observou-se que a apresentação da marcação no corte histológico possui resultados similares ao observado na avaliação proteica, com forte marcação no grupo CT em relação aos demais grupos.

PGC 1 α

Figura 24. Expressão por imuno-histoquímica de PGC1 α em amostras de músculo em animais tratados com dexametasona por 10 dias com ou sem a associação com ômega-3. Ampliação: 20X, Barra de escala = 50 μ m.

5.9.3. Via Ras/Raf/MEK/ERK

A via Ras/Raf/MEK/ERK não possui uma determinada função conhecida na atrofia muscular induzida por glicocorticoides, e pode demonstrar diferentes atuações dependendo do estuado de maturidade muscular. Dessa forma visamos identificar se havia alterações na expressão de componentes dessa via que possam justificar a influência do N-3 sobre a atrofia muscular induzida por DEXA. A avaliação da expressão da ERK (**Figura 25**) mostrou ter havido um aumento significativo na sua expressão total (ERK total) apenas no grupo DX2,5+N3 em comparação ao grupo CT e DX2,5 ($P<0,05$) e no grupo DX1,25+N3 em comparação ao grupo DX1,25 ($P<0,05$). Já a forma fosforilada do ERK1 (P-ERK1) e P-ERK1/ERK1/2 total mostrou-se significativamente diminuída nos grupos DX1,25, DX2,5, DX1,2+N3 ($P<0,05$ para todos) e com tendência a diminuição no grupo DX2,5+N3 ($P=0,09$) em comparação ao grupo CT, não tendo o N3 influenciado sua expressão. Já a expressão de P-ERK2 mostrou com significativa diminuição no grupo DX1,25 em relação ao grupo CT ($P<0,01$) com tendência a aumento no grupo N3 e à diminuição no grupo DX1,25+N3 em relação ao grupo CT. Todos os animais recebendo DEXA com ou sem a suplementação prévia de N-3 mostraram expressão diminuída na razão de P-ERK2/ERK1/2 total em relação ao grupo CT.

Os efeitos negativos sobre a via ERK demonstrados pela administração de dexametasona mostram que essa via, possivelmente, tem papel regulador positivo sobre o trofismo muscular *in vivo* e não com o processo de atrofia muscular.

Figura 25. Expressão proteica de ERK nas formas fosforiladas e total de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. *Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos em relação ao CT. Legenda: * ou # = P<0,05. Teste t de Student para comparação entre grupos.

5.9.4. Via Miostatina/Smad2/3

A miostatina (GDF8) é um regulador negativo do trofismo muscular, portanto, objetivamos saber se seus componentes (Smad2/3 e P-Smade2/3) teriam alterações de expressão que justificassem o aumento da atrofia muscular induzida pela associação de N-3 e DEXA. A expressão de Smad2/3 (**Figura 26**) mostrou não ter havido alterações na

expressão de Smad total em nenhum grupo em relação ao grupo CT. Entretanto, houve aumento significativo na expressão de P-Smad2 (forma ativa) no grupo DX2,5+N3 em relação ao grupo CT ($P<0,01$). Na expressão de P-Smad3 observou-se aumento significativo apenas nos grupos de associação DX1,25+N3 e DX2,5+N3 em relação ao grupo CT ($P<0,05$ para ambos). Sendo o aumento na expressão de P-Smad2/3/Smad2/3 total no grupo DX2,5+N-3 significativo em comparação ao grupo DX2,5 ($P<0,05$ em ambas comparações).

Figura 26. Expressão proteica de Smad2/3 na forma fosforilada e total de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. *Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos em relação ao CT. Legenda: * = $P<0,05$, ** = $P<0,01$. Teste t de *Student* para comparação entre grupos.

5.10. Análise de perfil de ácidos graxos

A análise inicial do perfil de ácidos graxos totais no músculo GA (**Figura 27**), visou saber se a suplementação de EPA/DHA aos animais causaria alterações na quantidade de demais ácidos graxos como o Ácido Araquidônico por exemplo, relacionado com a síntese proteica via prostaglandinas F2 α .

Observou-se um aumento na quantidade de DHA em animais recebendo EPA/DHA isoladamente ($P<0,05$) e diminuição no grupo de animais recebendo DX1,25 ($P<0,01$) em comparação ao grupo CT.

Houve uma diminuição significativa na quantidade de ácido araquidônico nos grupos N-3, DX1,25 e DX1,25+N3 e de ácido linoleico nos grupos N-3 e DX1,25 em comparação ao grupo CT.

Figura 27. Avaliação do perfil de ácidos graxos no músculo GA de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam resultado estatístico de comparação entre os grupos em relação ao CT. * = $P<0,05$; ** = $P<0,01$, *** = $P<0,001$. Teste estatístico: Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

5.11. Avaliação autofágica/lisossomal

De forma a avaliar se o aumento da atrofia muscular observado nos grupos de associação de DEXA com N-3 possui relação com um possível aumento da ação do sistema de degradação autofágico/lisossomal, sistema comumente ativo na atrofia por glicocorticoides, foi avaliado a expressão de LC3B-I e LC3B-II, bem como sua relação II/I, proteína relacionada com o número de autofagossomos no tecido (**Figura 28**), e a expressão de P62(SQSTM1), proteína relacionada com a autofagia de agregados proteicos ubiquitinados. Portanto, objetivamos uma avaliação indireta do nível de atividade lisossomal celular.

Observou-se que a expressão de LC3-I foi aumentada em todos os grupos recebendo DEXA com ou sem associação com N-3 em relação ao grupo CT (grupos DX1,25, DX2,5, DX1,25+N-3 e DX2,5+N-3, $P<0,001$ para todas as comparações).

Já a expressão de LC3-II foi aumentada em todos os grupos em comparação ao grupo CT, incluindo o grupo N-3. Observou-se também uma expressão elevada do LC3II nos grupos de associação DX1,25+N-3 e DX2,5+N-3 em relação aos grupos recebendo apenas DEXA: DX1,25 vs DX1,25+N-3 ($P=0,08$) e DX2,5 vs DX2,5+N-3 ($P<0,05$).

A razão de LC3II/LC3I foi significativamente aumentada nos animais recebendo DX+N3 em comparação àqueles recebendo apenas DEXA. DX1,25 vs DX1,25+N-3 ($P<0,05$) e DX2,5 vs DX2,5+N-3 ($P<0,001$). Indicando um provável aumento da atividade autofágica muscular ocasionada pela administração prévia de Ômega-3 em associação com dexametasona por 10 dias.

Figura 28. Expressão de LC3I e II por *western blotting* de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$), sustentados representam comparação estatística entre demais grupos (# = $P < 0,05$, ### $P < 0,001$). Teste estatístico: Teste *t* de *Student* para comparação entre grupos.

A avaliação do P62 mostrou um significativo aumento no acúmulo de P62 muscular nos grupos DX1,25, DX1,25+N-3 e DX2,5+N3 em comparação ao grupo CT. Houve diferença significativa na comparação do grupo DX2,5 em relação ao grupo DX2,5+N-3 (Figura 29).

Figura 29. Expressão de P62 por *western blotting* de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, sustentados representam comparação estatística entre demais grupos (## $P < 0,01$). Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

5.12. PCR em tempo Real.

5.12.1. Atrogenes

A avaliação da expressão de mRNA para os atrogenes (*REDD1*, *REDD2*, *Atrogin-1/MAFbx* e *MuRF-1*) (**Figura 30**) após 10 dias de administração de DEXA associado ou não à suplementação prévia de 30 dias com N-3 objetivou saber se associação destes causaria alterações na expressão de genes relacionados com aumento da atrofia muscular e bloqueio de síntese (REDD's).

Observou-se que a expressão de *REDD-1* (**Figura 30 A**) foi significativamente aumentada apenas em animais recebendo N-3 em associação com DEXA (grupos DX1,25+N-3 e DX2,5+N-3) em comparação ao grupo CT ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente), com tendência de aumento no grupo DX1,25 em relação ao grupo CT ($P = 0,08$). Tal aumento na expressão do grupo DX2,5+N-3 foi significativamente maior que em relação ao grupo DX2,5 ($P < 0,001$).

Na expressão de *REDD2* observou aumento significativo em todos os grupos recebendo DEXA com ou sem associação com N-3 em relação ao grupo CT, não tendo sido observada diferença entre grupos (**Figura 30 B**).

A expressão da *Miostatina* mostrou-se significativamente aumentada nos grupos DX1,25 e DX1,25+N3 em relação ao grupo CT ($P<0,05$ para ambos). Havendo um significativo aumento de sua expressão em relação ao grupo DX2,5 ($P<0,05$) (**Figura 30 C**).

Já a expressão de *MuRF-1* mostrou-se significativamente aumentada em animais recebendo DEXA com ou sem associação ao N-3 em relação ao grupo CT (**Figura 30 D**) sendo a expressão de *MuRF-1* aumentada no grupo DX2,5+N-3 em relação ao grupo DX1,25+N-3 ($P<0,05$).

A expressão de *Atrogina-1/MAFbx* mostrou-se significativamente aumentada em todos os grupos recebendo DEXA com ou sem associação ao N-3 em relação ao grupo CT (**Figura 30 E**) havendo aumento significativo da expressão de *Atrogina-1* no grupo DX2,5+N-3 em comparação ao grupo DX2,5 ($P<0,05$).

Estes dados de maneira geral indicam que a administração de DEXA leva a um aumento na expressão de Atrogenes e que em doses menores (DX1,25mg/kg/dia) a expressão de *Miostatina* e *Atrogina-1* ainda permanecem elevados em relação ao dobro da dosagem por 10 dias. O N-3 influencia a expressão de *REDD-1* e *Atrogina-1* quando associado com DEXA em maior dosagem (2,5 mg/kg/dia).

Figura 30. Expressão de mRNA por PCR em tempo real de *REDD1*, *REDD2*, *Miostatina*, *MURF-1*, *Atrogina-1/MAFBX* e *GAPDH* de animais recebendo N-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$), sustentados representam comparação estatística entre demais grupos (# = $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$).

5.12.2. Genes reguladores de síntese e receptores

A avaliação de genes reguladores de síntese muscular (*MYOD* e *MYOG*) ou de resposta ao IGF-1/Insulina (*IRS1/2* – Substrato do receptor da insulina 1/2) mostrou que a expressão de *MYOG* (*Miogenina*) (**Figura 31 A**) foi aumentada apenas no grupo DX1,25+N-3 em relação ao grupo CT e em comparação ao grupo DX2,5+N-3 ($P<0,05$ para ambos) com tendência a aumento em relação ao grupo DX1,25 ($P=0,09$).

Em relação à expressão de *MYOD* houve diminuição significativa na expressão de mRNA apenas no grupo DX2,5+N-3 em relação ao grupo CT ($P<0,05$) com tendência a diminuição no grupo DX1,25+N-3 ($P=0,09$) (**Figura 31 B**). Com diminuição significativa do grupo DX2,5+N-3 em comparação ao grupo DX2,5 ($P<0,05$) e tendência à diminuição no grupo DX1,25+N-3 em comparação ao grupo DX1,25 ($P=0,06$).

A expressão do substrato 1 do receptor da insulina (*IRS-1*) (**Figura 31 C**) mostrou-se significativamente diminuído em todos os grupos de estudo, incluindo grupo N-3, em comparação ao grupo CT ($P<0,05$ em relação ao grupo N-3 e $P<0,001$ em relação aos demais grupos). Já a expressão do *IRS-2* (**Figura 31 D**) mostrou-se diminuída apenas nos grupos DX1,25+N-3, DX2,5 e DX2,5+N-3 em comparação ao grupo CT ($P<0,05$ em relação aos grupos DX1,25+N-3, DX2,5 e $P<0,01$ em relação ao grupo DX2,5+N-3). A expressão do *IRS-2* foi significativamente diminuída comparando DX1,25 vs DX2,5 ($P<0,05$).

Figura 31. Expressão de mRNA por PCR em tempo real de *MYOD*, *MYOG*, *IRS-1* e *IRS-2* de animais recebendo ômega-3 por 40 dias em associação ou não com DEXA nos últimos 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$), sustenidos representam comparação estatística entre demais grupos (# = $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$).

SESSÃO 2: COMPARAÇÃO ENTRE A AÇÃO DE DIFERENTES GLICOCORTICOIDES EM DOSES EQUIPOTENTES SOBRE O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

5.13. Massa corporal

Observou-se um aumento linear, progressivo e equivalente no peso dos animais do dia da admissão dos animais até o início da administração de drogas, ou seja, 30º dia (**Figura 32**). Após o início da administração de drogas, a partir do 2º até 10º dia de estudo, observou-se diminuição significativa no peso corporal dos animais em relação ao grupo CT ($P<0,001$ para todos os grupos) (**Tabela 6**). Observou-se ainda que a média de peso corporal dos animais recebendo metilprednisolona na dosagem de 13,3 mg/kg/dia foi significativamente menor que os demais grupos, incluindo os grupos recebendo dexametasona à 2,5 mg/kg/dia e deflazacorte à 20 mg/kg/dia ($P<0,01$ em ambas comparações).

Figura 32. Curva de massa corporal dos animais durante o desenvolvimento do estudo. Média $\pm$ SD. Linha pontilhada representa o início da administração de glicocorticoides.

Tabela 6. Massa corporal no decorrer do estudo.

Grupos	Dias de estudo						
	1	30	32	34	36	38	40
CT	317,0g	427,9g	436,5g	443,7g	449,5g	451,8g	461,4g
DX 1.25	339,4g	433,9g	414,1g	390,4g***	367,4g ***	348,0g ***	336,7g***
DX 2.5	328,1g	443,3g	422,9g	398,0g **	374,6g ***	357,1g ***	335,5g***
DC 10	317,5	418,2	380,2 ***	379,7 ***	368,5 ***	355,3 ***	353,0 ***
DC 20	320,3	433,2	398,4 **	385,0 ***	365,2 ***	350,0 ***	339,8 ***
MP 6	336,6	439,0	400,5 *	368,5 ***	346,0 ***	323,4 ***	317,0 ***
MP 13	319,1	436,0	388,1 ***	354,8 ***	331,4 ***	313,1 ***	293,4 ***
				** vs DX2.5	** vs DX2.5	** vs DX2.5	** vs DX2.5
						* vs DC 20	** vs DC 20

Teste estatístico: Anova de duas vias. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. Asteriscos representam comparação com o grupo CT.

A média de peso do grupo CT (N=10) foi de 317,0g e final de 461,4g, representando um ganho de peso corporal de 31,29%. O grupo de animais recebendo DX1,25 (N=9) teve média de peso inicial de 339,4g e de 433,9g no 30º dia, com peso final de 336,7g, representando perda de 22,4% após 10 dias de administração de droga e de 27,02% em comparação ao grupo CT.

Já o grupo de animais recebendo DX 2,5 (N=8) teve média de peso inicial de 328,1g e de 443,3g no 30º dia, com peso final de 335,5g, representando uma perda de peso de 24,31% após 10 dias de administração da droga e de 27,28% em comparação ao grupo CT.

O grupo de animais recebendo DC10 (N=10) teve média de peso inicial de 317,5g e de 418,2g no 30º dia, com peso final de 353,0g, representando perda de 15,59% após 10 dias de administração da droga e de 23,49% em comparação ao grupo CT. Já o grupo de animais recebendo DC20 (N=10) teve média de peso inicial de 320,3g e de 433,2g no 30º dia, com peso final de 339,8g, representando perda de 21,56% após 10 dias de administração da droga e de 26,35% em comparação ao grupo CT

O grupo de animais recebendo MP6 (N=8) teve média de peso inicial de 336,6g e de 439g no 30º dia, com peso final de 317g, representando perda de 27,79% após 10 dias de administração da droga e de 31,29% em comparação ao grupo CT. Já o grupo de animais recebendo MP13 (N=8) teve média de peso inicial de 319,1g e de 436,0g no 30º dia, com peso final de 293,4g, representando perda de 32,70% após 10 dias de administração da droga e de 36,41% em comparação ao grupo CT. Sendo a droga com maior impacto sobre o peso corporal.

Comparando entre grupos de intervenção, animais recebendo MP13 mostraram significativa perda de peso em comparação aos grupos de dose equivalente DX2,5 e DC20 ($P < 0,01$ para ambos).

5.14. Peso Muscular

A avaliação do peso das amostras musculares coletadas, tanto GA como TA, correspondem ao observado na curva de peso corporal, com grande perda do peso muscular nos grupos que receberam glicocorticoides em relação ao grupo CT ($P < 0,001$ em todas as comparações) (**Figura 33**).

Avaliando os glicocorticoides de forma comparativa, animais do grupo MP13 mostraram significativa maior perda de peso muscular de GA em relação aos demais grupos de equivalência DX2,5 e DC20 bem como em relação ao seu grupo de menor dosagem MP6 ($P < 0,001$ para ambos). O mesmo aconteceu para o TA, entretanto, mostrando menor perda de peso em comparação apenas ao grupo DC20 ($P < 0,001$).

O grupo DC10 foi o que mostrou menor impacto no peso muscular de GA ou TA em comparação aos demais grupos de dosagem equivalente MP6 ou DX 1,25 ($P < 0,01$ em ambas comparações).

Figura 33. Peso de amostras musculares de gastrocnêmio e tibial anterior coletadas após 10 dias de administração de diferentes glicocorticoides em ratos. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (Anova de uma via); Sustenidos representam comparações entre 2 grupos (*teste t*). ## = $P < 0,01$; *** ou #### = $P < 0,001$.

5.15. Peso da glândula adrenal

Da mesma forma que realizada na sessão 1 (comparação DX e DX+N-3), foram coletadas e pesadas as glândulas adrenais dos animais do estudo entre diferentes glicocorticoides (**Figura 34**) visando saber qual dos seguintes medicamentos influenciariam mais o eixo Hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA).

Com exceção dos grupos DC10 e MP6, houve uma diminuição significativa no peso da glândula adrenal em todos os grupos em comparação ao grupo CT ($P < 0,001$ para todos).

A diminuição observada no grupo DX1,25 foi de 52,61%, no grupo de DX2,5 de 49,69%, no grupo DC10 de 25,06%, no grupo DC20 de 45,30%, no grupo MP6 de 27,71% e no grupo MP13 de 47,89% em comparação ao grupo CT. Os glicocorticoides metilprednisolona e deflazacorte em dosagens de 6,3 e 10 mg/kg/dia, respectivamente, não trouxeram impacto sobre o trofismo da glândula adrenal como causado pela dexametasona em dosagem equivalente de 1,25 mg/kg/dia.

Figura 34. Peso da glândula adrenal coletada ao fim do período de 10 dias de administração de diferentes glicocorticoides. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (Anova de uma via); Sustenidos representam comparações entre 2 grupos (teste *t*). # = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; *** ou ### = $P < 0,001$.

5.16. Área de secção transversa da fibra muscular

A área de secção transversa da fibra muscular de TA foi avaliada nos seus diferentes tipos de fibras (**Figuras 35 e 36**): Em fibras do tipo 1, observou-se que apenas os grupos DX1,25 e DC10 mostraram diminuição significativa em relação ao grupo CT ($P < 0,05$). Houve diferença em relação aos seus controles de maior dosagem DX2,5 ($P < 0,05$) e DC20 ($P = 0,09$). Em fibras do tipo 2A não foi observada diminuição na área das fibras em nenhum dos 6 grupos em relação ao grupo CT ou entre grupos.

Em fibras do tipo 2B, foi observada diminuição significativa na área das fibras de todos os grupos em comparação ao grupo CT ($P < 0,001$ para todos).

Entretanto, dentre os grupos de glicocorticoides houve variação importante: animais do grupo DC10 apresentaram maior área de fibras 2B em comparação ao seu grupo de maior dosagem (DC20, $P < 0,05$) e em comparação aos grupos de dose equipotente, DX1,25 e MP6 ($P < 0,01$ para ambos).

Figura 35. Área de secção transversa das fibras musculares após 10 dias de administração de diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente. Asteriscos representam resultado estatístico da comparação dos grupos em relação ao grupo CT (Anova de uma via para cada tipo de fibra). Sustenidos resultados da comparação entre 2 grupos (teste *t*). * ou # = $P<0,05$; **= $P<0,01$ e ***= $P<0,001$

Figura 36. Coloração por mATPase do músculo TA de animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagens equipotentes por 10 dias. Barra de escala = 100µm. Seta= fibras do tipo 1; *= fibras do tipo 2A; cabeça de seta= fibras 2B.

5.17. Proporção de fibras musculares entre diferentes glicocorticoides

A avaliação da proporção de fibras musculares após 10 dias de administração de diferentes glicocorticoides (**Figura 37, Tabela 7**) mostrou que houve significativa diminuição na proporção de fibra 1 nos grupos recebendo metilprednisolona (MP13 e MP6) em relação ao grupo CT ($P<0,01$ e $P<0,05$, respectivamente). A proporção de fibra 1 no grupo MP6 foi significativamente menor que em relação aos grupos de dosagem equipotente DX1,25 e DC10 ($P<0,05$ para ambos).

Em fibras do tipo 2A houve aumento significativo na proporção de fibras 2A nos grupos DX2,5 ($P<0,01$) e DC10 ($P<0,05$) em comparação ao grupo CT. O mesmo aumento foi significativo comparando o grupo DX2,5 ao grupo DX1,25 ($P<0,01$). Observou-se que o grupo MP13 apresentou a menor proporção de fibras 2A em relação aos demais grupos em dosagem equipotente, DX2,5 ($P<0,01$) e DC20 ($P<0,05$).

Em fibras 2B observou-se que o grupo MP13 mostrou a maior proporção de fibras em relação ao grupo CT ($P<0,05$) e em relação aos demais grupos em dosagem equipotente, DX2,5 ($P<0,01$) e DC20 ($P<0,01$).

Figura 37. Proporção de fibras musculares 1, 2A e 2B no músculo TA de ratos submetidos a administração de diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias.

Tabela 7. Contagem de proporção de fibra 1, 2A e 2B entre os grupos recebendo diferentes glicocorticoides por 10 dias. Teste estatístico: *Mann-Whitney* para comparação entre grupos.

Proporção de Fibras (músculo TA)						
	Fibra 1	valor de <i>P</i>	Fibra 2A	valor de <i>P</i>	Fibra 2B	valor de <i>P</i>
CT	<u>12,83%</u>	<i>P</i> =0,0040** vs MP6 <i>P</i> =0,0213* vs MP13	<u>27,17%</u>	<i>P</i> =0,0023** vs DX2,5 <i>P</i> =0,0180* vs DC10	<u>60,00%</u>	<i>P</i> =0,0296* vs MP13
DX1,25	<u>12,18%</u>	-	<u>26,50%</u>	<i>P</i> =0,0006** vs DX2,5	<u>61,32%</u>	-
DX2,5	<u>10,52%</u>	-	<u>34,56%</u>	-	<u>54,92%</u>	-
MP6	<u>5,60%</u>	<i>P</i> =0,0406* vs DX1,25 <i>P</i> =0,0464* vs DC10	<u>30,66%</u>	<i>P</i> =0,0652 vs MP13	<u>63,74%</u>	-
MP13	<u>5,87%</u>	-	<u>25%</u>	<i>P</i> =0,0273* vs DC20 <i>P</i> =0,0019** vs DX2,5	<u>69,13%</u>	<i>P</i> =0,0011** vs DX2,5 <i>P</i> =0,0010** vs DC20
DC10	<u>8,72%</u>	-	<u>32,60%</u>	-	<u>58,69%</u>	-
DC20	<u>9,54%</u>	-	<u>31,03%</u>	-	<u>59,43%</u>	-

5.18. Western Blotting

5.18.1. Via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR

Comparando diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente observou-se que a expressão de Akt total (**Figura 38**) em animais recebendo DX 1,25 e 2,5 é significativamente menor que em relação ao grupo CT ($P<0,05$ para ambos) e em comparação à demais glicocorticoides o grupo DX1,25 mostrou menor expressão em comparação ao grupo DC10 ($P<0,05$) e MP6 ($P<0,01$). Não foram observadas diferenças entre os grupos de maior dosagem em comparação aos de menor dosagem recebendo a mesma droga.

Na expressão de P-Akt observou-se diminuição significativa em todos os grupos em relação ao grupo CT, exceto o grupo MP13, com significativa diminuição no grupo DX1,25 em comparação a demais grupos de glicocorticoides em dosagem equipotente.

A expressão de GSK3 β (**Figura 35**) mostrou que apenas animais do grupo DC20 tiveram aumento significativo em comparação ao grupo CT ($P<0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos de maior dosagem em comparação aos de menor dosagem recebendo a mesma droga. Já a expressão de P-GSK3 β (Ser9) foi significativamente diminuída nos grupos DX1,25, MP6 e DC20 em relação ao grupo CT ($P<0,05$ para todos).

Figura 38. Expressão de AKT e GSK3β total e fosforilada em animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias. *Asterisco representa comparação estatística em relação ao grupo CT. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$. Teste estatístico: Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

A expressão de FOXO3a total (**Figura 39**) mostrou que o grupo DC20 teve significativo aumento em relação ao grupo CT ($P < 0,05$), sem aumento significativo nos demais grupos. Já a expressão de P-FOXO3a (Ser253) e na razão de P-FOXO3a/FOXO3a total observamos significante diminuição da expressão em todos os grupos em comparação ao grupo CT, não havendo diferença entre grupos de glicocorticoide.

Figura 39. Expressão de FOXO3a total e fosforilado (Ser253) em TA em animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias. *Asterisco representa comparação estatística em relação ao grupo CT. * = $P < 0,05$. Teste estatístico: Teste t de Student para comparação entre grupos.

5.18.2. Via Ras/Raf/MEK/ERK

A expressão de ERK1/2 total entre diferentes glicocorticoides não aponto diferenças entre grupos em comparação ao grupo CT (**Figura 40**).

Avaliando as formas fosforiladas do ERK1/2 (Thr202/Tyr204) observou-se diminuição significativa de P-ERK1 nos animais dos grupos DX2,5, MP6 e MP13 em relação ao grupo CT. Na razão de P-ERK1/ERK total o grupo MP6 foi a que mais impactou a expressão em sua expressão, bem como na expressão de P-ERK1 em relação a demais glicocorticoides em dosagem equipotente. O mesmo foi observado na expressão de P-ERK2, com significativa diminuição da expressão de P-ERK2 nos grupos DX2,5, MP6 e MP13 em relação ao grupo CT, com mais impacto no grupo MP6 em relação aos demais em dosagem

equipotente. Já na razão de P-ERK2/ERK total os grupos recebendo MP e DC mostraram diminuição significativa em comparação ao grupo CT.

Figura 40. Expressão de ERK1/2 total e fosforilado (Thr202/Tyr204) em TA em animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias. *Asterisco representa comparação estatística em relação ao grupo CT. $*$ = $P < 0,05$, $**$ $P < 0,01$. Sustenido representa comparação estatística entre grupos ($\#$ $P < 0,05$, $\##$ $P < 0,01$) Teste estatístico: Teste t de Student para comparação entre grupos.

5.18.3. Via Miostatina/Smad2/3

A avaliação da expressão de Smad2/3 total e fosforilada (Ser423/425) (**Figura 41**) mostrou ter havido aumento significativo na expressão de Smad2/3 total nos grupos MP6,

MP13 e DC20 em comparação ao grupo CT, havendo, significativa diferença entre os grupos DX2,5 e MP13 ($P<0,05$). A expressão de P-Smad2 foi significativamente aumentada apenas no grupo DC20 em comparação ao grupo CT ($P<0,05$) e em comparação ao grupo DC10 ($P<0,05$). Já a expressão de P-Smad3 foi aumentada nos grupos DX1,25, MP6, MP13, DC20 em relação ao grupo CT. Na razão de P-Smad3/Smad total apenas o grupo DX2,5 mostrou aumento significativo em relação ao CT, sem diferença nos demais grupos.

Figura 41. Expressão de Smad2/3 total e fosforilado (Ser423/425) em TA após a administração de diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente. * = $P<0,05$. Teste estatístico: Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

5.19. PCR em tempo real

5.19.1. Atrogenes

A avaliação de Atrogenes após 10 dias de diferentes glicocorticoides mostrou na expressão de *REDD-1* que houve aumento significativo em sua expressão apenas nos grupos recebendo metilprednisolona (grupo MP6 e MP13) em relação ao grupo CT e em comparação aos grupos de dosagem equipotente ($P < 0,001$ em todas as comparações) (**Figura 42 A**). Já a expressão do *REDD-2* (**Figura 42 B**) mostrou expressão com aumento significativo em todos os grupos, com tendência de aumento no grupo DC20 ($P = 0,07$), em comparação ao grupo CT. Houve diferença significativa entre os grupos DX2,5 e DC20 ($P < 0,05$).

A expressão de *Miostatina* foi significativamente aumentada em todos os grupos recebendo glicocorticoides, exceto nos grupos DX2,5 e DC20, em comparação ao grupo CT (**Figura 42 C**). Houve diferença significativa entre a expressão de *Miostatina* comparando os grupos DC10 com DC20 ($P < 0,05$) e tendência de aumento no grupo DX1,25 com DX2,5 ($P = 0,08$).

A expressão de *MuRF-1* foi significativamente aumentada em nos grupos recebendo DEXA e metilprednisolona em comparação ao grupo CT, sem nenhum aumento no grupo DC10 ou DC20 (**Figura 42 D**). Observou-se aumento significativo no grupo MP13 em comparação aos grupos de dose equipotente (DX2,5 – $P < 0,05$ e DC20 – $P < 0,001$), bem como na comparação entre o grupo MP6 com os grupos de dose equipotente (DX1,25 – $P < 0,01$ e DC10 – $P < 0,001$).

Na expressão de *Atrogina-1/MAFBX* (**Figura 42 E**) observou-se que todos os grupos recebendo glicocorticoides tiveram aumento significativo de sua expressão em comparação ao grupo CT. Tendo os grupos DC10 e DC20 mostrado a menor expressão de *Atrogina-1* em comparação aos demais glicocorticoides em dosagem equipotente. DC10 vs MP6 ($P < 0,01$) e vs DX1,25 ($P < 0,05$); DC20 vs MP13 ($P < 0,001$) e vs DX2,5 ($P < 0,01$).

Figura 42. Expressão de mRNA por PCR em tempo real de *REDD1*, *REDD2*, *Miostatina*, *MuRF-1*, *Atroquina-1/MAFBX* e *GAPDH* de animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$), sustentados representam comparação estatística entre demais grupos (# = $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$).

5.19.2. Genes reguladores de síntese

A avaliação da expressão de reguladores miogênicos (*MYOD* e *MYOG*) e substratos do receptor da insulina (*IRS1* e *IRS2*) entre os glicocorticoides mostrou ter havido um aumento na expressão de *MYOG* apenas nos grupos recebendo metilprednisolona (MP6 e MP13) e no grupo DC10 em comparação ao grupo CT (**Figura 43 A**). Tal aumento na expressão do *MYOG* nos grupos MP6 e MP13 foi significativo em comparação aos grupos de dose equipotente: MP6 vs DX1,25 e DC10 ($P<0,05$ para ambos); MP13 vs DX2,5 ($P<0,01$) e vs DC20 ($P<0,001$).

A expressão de *MYOD* mostrou-se diminuída apenas no grupo MP6, sem alteração nos demais grupos em relação ao CT ($P<0,01$) e em comparação aos demais grupos com dosagem equipotente DX1,25 e DC10 ($P<0,05$ para ambos) (**Figura 43 B**).

A expressão de IRS-1 mostrou-se significativamente diminuída apenas nos grupos recebendo DEXA (grupos DX1,25 e DX2,5) em comparação ao grupo CT ($P<0,001$ para ambos) (**Figura 43 C**). Sendo essa expressão nos grupos recebendo DX significativamente menores comparando com grupo de dosagem equipotente de glicocorticoides: DX1,25 vs DC10 e MP6 ($P<0,001$ para ambos) e DX2,5 vs MP13 ($P<0,05$) e DC20 ($P<0,01$). Já a expressão de IRS2 (**Figura 43 D**) mostrou-se diminuída apenas nos grupos DX2,5, DC10 e DC20 em comparação ao grupo CT ($P<0,05$ para todos), entretanto observou-se aumento na expressão de MP13 em comparação ao grupo CT ($P<0,05$) e em comparação aos demais grupos com dose equipotente (DX2,5 e DC20 – $P<0,001$ para ambos). A diminuição da expressão de *IRS2* foi significativa menor no grupo DX2,5 em comparação ao grupo DX1,25 ($P<0,05$).

Figura 43: Expressão de mRNA por PCR em tempo real de *MYOG*, *MYOD*, *IRS-1*, *IRS-2* e *GAPDH* de animais recebendo diferentes glicocorticoides em dosagem equipotente por 10 dias. Asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$), sustenidos representam comparação estatística entre demais grupos (# = $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este projeto de doutorado objetivou avaliar a interação da associação do ômega-3 (N-3) com a dexametasona no contexto de ação sobre a atrofia muscular, determinando seus mecanismos de ação relacionado com as vias de sinalização envolvidas com a manutenção do trofismo muscular e degradação e, adicionalmente, avaliar o impacto de diferentes glicocorticoides, em diferentes dosagens (de forma equipotente) sobre a atrofia muscular esquelética.

De forma a melhor apresentar a discussão e interpretação dos dados relacionados com estes dois temas distintos vamos seguir com essa sessão separadamente, da mesma forma como apresentado nos resultados, em duas sessões: a interação do N-3 com a dexametasona e comparação entre diferentes glicocorticoides em dosagens equipotentes.

6.1. Associação entre EPA/DHA e Dexametasona

A utilização de N-3 ou EPA/DHA de forma isolada ou conjunta, tem sido descrita na literatura com objetivos diversos, em geral pelas suas propriedades anti-inflamatórias, e dentre eles o de atenuar atrofia muscular induzida por diferentes condições, como o câncer e septicemia (Whitehouse *et al.*, 2001; Khal e Tisdale, 2008). Em estudo prévio realizado por nós (Fappi *et al.*, 2014) buscamos o mesmo objetivo, a prevenção da atrofia muscular. Entretanto, verificamos um efeito foi oposto, com maior prejuízo às fibras musculares (após suplementação prévia de 100mg/kg/dia de EPA seguido da associação com a dexametasona à 5mg/kg/dia); porém, não tendo sido possível elucidar completamente seus mecanismos de ação, o que deu base a este projeto de pesquisa atual além de inúmeros outros projetos secundários dentro deste, alguns, ainda em avaliação.

No entanto, após a conclusão do proposto nesse estudo foi possível determinar que a suplementação prévia e concomitante do ômega-3 (100mg/kg/dia de EPA) na associação com a administração de 2,5 e 1,25 mg/kg/dia de dexametasona conduz a impacto negativo no desenvolvimento da atrofia muscular, verificados pelo menor área de secção transversa das fibras musculares, sobre a expressão de proteínas da via do IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR (FOXO3a, P-FOXO3a – Ser253), via Miostatina/Smad2/3 (P-Smad2/3), tGR, LC3II, P62 e, por fim sobre a expressão de mRNA de *REDD1*, *Atrogina-1* e *IRS-1*.

Demonstramos também neste estudo que o N-3 de forma isolada ou em associação com o dexametasona não causa impacto sobre o peso muscular, corporal ou da glândula adrenal (eixo HPA), via Ras/Raf/MEK/ERK, além do causado pela dexametasona.

Dosagem de dexametasona

No estudo prévio havíamos utilizado uma dosagem de 5 mg/kg/dia com a associação da mesma dose de EPA (100mg/Kg/dia) e no atual projeto as dosagens foram ajustadas para 2,5 e 1,25 mg/kg/dia, de forma a responder se a dosagem seria um determinante para a interação com o N-3.

No tratamento dos animais, verificamos que a administração de dexametasona nas dosagens de 1,25 e 2,5 mg/kg/dia e metilprednisolona (MP) 13,3 e 6,7 mg/kg/dia ocasionaram a morte de alguns animais e, embora sejam bem descrito na literatura os efeitos causados pela administração de glicocorticoides sobre o organismo (**Chrousos *et al.*, 2004; Schakman *et al.*, 2013**), não se sabe ao certo a causa da morte dos animais após essa alta exposição. Um dos efeitos proeminentes na administração de glicocorticoides é a perda de massa consideravelmente alta em poucos dias, decorrente da perda de massa muscular, portanto, o observado em nosso estudo pela pesagem de GA e TA eram esperadas, e confirmam eficácia na administração das drogas com fins de atrofia muscular, uma vez que é demonstrado que a dexametasona e os glicocorticoides em geral acarretam impacto, principalmente, sobre fibras de contração rápida (**Prezant *et al.*, 1997; Sandri *et al.*, 2006**), e tendo tais músculos considerável proporção de fibras 2B, houve a perda de peso destes músculos. Estudos preliminares utilizando tais dosagens de dexametasona (5 e 2,5mg/kg/dia) já demonstraram atrofia nestes músculos, correspondendo, portanto, ao impacto direto dos glicocorticoides ao tecido muscular (**Kelly e Goldspink, 1982; Kelly *et al.*, 1986**).

A administração de dexametasona em grandes dosagens induz sintomas similares ao hipercortisolismo espontâneo acarretando níveis plasmáticos elevados de glicocorticoides, o que suprime a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pelo eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) por *feedback* negativo. Devido ao efeito trófico do ACTH sobre o córtex da glândula suprarrenal (zona fasciculata e reticular), a supressão de sua liberação durante a administração da dexametasona resulta na atrofia da glândula adrenal (**Karatsoreos *et al.*, 2010; Pey *et al.*, 2012**) corroborando com nosso estudo, com significativa atrofia da glândula adrenal em todos os grupos recebendo dexametasona. O N-3 isoladamente causou diminuição de 19,04% no peso da glândula adrenal após os 40 dias

de suplementação, embora isso estatisticamente não deva ser considerado, o N-3 pode, de alguma forma, ter causado alterações no eixo HPA com mecanismo de *feedback* positivo. A influência de ácidos graxos livres plasmáticos sobre o eixo HPA é um dado descrito na literatura (**Takeuchi et al., 2003; Lanfranco et al., 2004; Song et al., 2004**). Estudos mostraram que o N-3 efetivamente incorporado pela glândula adrenal influencia em curto prazo (estudo em porcos) (**Liu et al., 2013**) a expressão sérica de ACTH portanto, os altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados sanguíneos podem trazer algum efeito sobre o eixo HPA, como observado após o uso de DHA (ômega-6) por 50 dias em ratos (**Jiang et al., 2012**), com significante diminuição de ACTH hipotalâmico. Sendo necessários mais estudos para avaliação mais pontual sobre a influência do EPA/DHA sobre o eixo HPA.

Uma das perguntas do estudo estava relacionado com uma possível alteração na sinalização celular, relacionada com um aumento da expressão de receptor de glicocorticoides (GR). Entretanto, a associação do ômega-3 com dexametasona não trouxe impactos sobre a expressão da fosforilação da Ser211 do receptor de glicocorticoide (sinalizando atividade de transcrição nuclear) (**Wang et al., 2002**), apenas influenciando a expressão total do receptor quando em associação à dosagem de 2,5mg/kg/dia de dexametasona.

Isso não corrobora com a hipótese de *feedback* de receptor descrita no estudo de **Kalinyak et al., (1987)** o qual aponta para uma regulação tecido-específica da quantidade de receptor de glicocorticoide (mRNA). Em seu estudo, após 6hs de exposição de dexametasona (7 mg/kg) em ratos, observou-se uma diminuição significativa de mRNA do GR de 40 a 60% em diversos tecidos avaliados (pulmão, pâncreas, cérebro, fígado, rim, glândula adrenal e coração) em ratos tratados com dexametasona, havendo, ainda, aumento na quantidade de mRNA de GR em ratos normais adrenalectomizados. Os autores argumentam que o aumento ou diminuição da quantidade de receptores constitui um processo de regulação por *feedback negativo* frente aos níveis de glicocorticoide presente, adequando a resposta do tecido pelos níveis de produção de receptor (**Kalinyak et al., 1987**). Considerando tais estudos, podemos supor que, em nosso trabalho, após alta exposição a dexametasona por 10 dias, por mecanismo de *feedback* negativo manteve uma baixa expressão de GR total, que poderia – baseado na hipótese – se apresentar negativa em relação ao grupo CT. Entretanto, mostraram-se em níveis basais após 10 dias de dexametasona. A expressão do GR total no grupo DX 2,5+N3 foi aumentada em relação ao grupo CT e DX2,5, não sendo possível elucidar tal achado.

Nosso estudo condiz com o encontrado por **Umeki et al. (2015)** no qual não houve alteração nos níveis de tGR em animais recebendo dexametasona (6mg/kg por 2 semanas).

No caso da fosforilação do receptor na P-GR na Ser211 já era esperado que a administração de dexametasona aumentasse sua expressão uma vez que está relacionada com a atividade de transcrição do receptor (**Wang et al., 2002**). Portanto, a resposta observada para aumento proporcional na expressão de P-GR na Ser211 ocorreu, tendo o N-3 influenciado com menor fosforilação no grupo DX2,5+N-3 em relação ao grupo DX2,5. Embora seja demonstrado por demais autores que o ômega-3 pode se associar com a membrana e influenciar a atividade de receptores (**Surette, 2008**) seriam necessários mais estudos para confirmação da influência sobre o GR. Avaliamos aqui a variante 3 de receptor nuclear grupo C1 do GR; para conclusão da avaliação de interação de receptor com o N-3, acreditamos que a avaliação das três isoformas principais do receptor (GR α , β and γ) as quais mostram diferentes funções e localizações (**Kadmiel e Cidlowski, 2013**) possa elucidar essa questão ou, ainda, avaliar isoladamente receptores de glicocorticoide associados à membrana, não completamente elucidados, mGRs (*Membrane glucocorticoid receptors*) (**Tasker et al., 2006; Wang et al., 2014**).

Atrofia muscular

Já é bem descrito na literatura que a atrofia muscular induzida por glicocorticoides ocorre preferencialmente nas fibras do tipo 2B, estando isso, em parte, relacionado com a menor expressão de PGC1 α nessas fibras, o qual atenuaria a atividade de FoxOs e protegeria este tecido da ação do glicocorticoide (**Sandri et al., 2006; Qin et al., 2010**). Já a atrofia muscular em fibras do tipo 1 e 2A após a associação de dexametasona (5 mg/kg/dia) com N-3 é um dado recente publicado por nós (**Fappi et al., 2014**), entretanto, sem nenhuma elucidação do seu mecanismo.

Em nosso atual estudo a avaliação sobre a expressão de PGC1- α deu “luz” a um novo mecanismo de interação do N-3 ao DEXA que pode explicar parcialmente sua ação sobre a atrofia por glicocorticoides. A avaliação da expressão de PGC1 α por meio do *western blotting* e imuno-histoquímica (qualitativa) demonstraram que a suplementação de ômega-3 por 40 dias pode influenciar sua expressão proteica, influenciando a proteção da fibra na administração de dexametasona na dosagem de 1,25mg/kg/dia por 10 dias.

Sua marcação na fibra muscular, fibras do tipo 2A e 1 ocorre pois sua ativação está diretamente relacionada com o remodelamento e biogênese mitocondrial e angiogênese

estando assim diretamente relacionado com fibras oxidativas (**Yan et al., 2011**), mas sua baixa expressão nos grupos N-3, DX1,25 e DX1,25+N-3, grupos esse que também mostram menor área das fibras musculares do tipo 1 e 2A, nos leva a acreditar na correlação entre a baixa expressão de PGC1- α e maior atrofia muscular frente a exposição por glicocorticoides, uma vez que esta confere proteção contra a ação da dexametasona por exemplo (**Sandri et al., 2006; Qin et al., 2010**).

No entanto, outros trabalhos referem ao N-3 como um potencializador da biogênese mitocondrial e da expressão de genes como o PGC1- α em C2C12 por 24hs (**Lee et al., 2016**) e C6 (glioma) por 48hs (**Jeng et al., 2009**) o que não condiz pelo observado por nós, embora tais estudos tenham sido realizados em células por curto período de tempo, sendo normalizado após 48hs *in vitro* (**Vaughan et al., 2012**). Nosso estudo corrobora com a diminuição de PGC1- α após a administração isolada de DEXA (**Jesinkey et al., 2014**).

A atrofia muscular observada em fibras do tipo 1 em animais recebendo isoladamente 1,25 mg/kg/dia de dexametasona e não com o dobro da dosagem (2,5mg/kg/dia) foi inesperado. Entretanto, outros estudos utilizando diferentes dosagens de glicocorticoides também observaram, da mesma forma, maior nível de atrofia muscular (diafragmática) em animais recebendo menores níveis de glicocorticoide em relação àqueles recebendo maiores dosagens. **Maes et al. (2008)** mostraram que administração de doses de metilprednisolona entre 30 e 80 mg/kg/dia por 24 horas em ratos causou a atenuação dos efeitos da disfunção diafragmática durante ventilação mecânica sem impacto sobre a área das fibras. No entanto, o uso de menor dosagem 5mg/kg/dia, provocou significativa atrofia diafragmática (**Maes et al., 2008; Maes et al., 2010**). Os autores postularam que a alta dose de glicocorticoide é capaz de inibir a atividade de calpaínas, reduzindo a degradação proteica e, portanto, protegendo a fibra de danos sobre a área de secção transversa (atualmente desenvolvemos estudos sobre a Calpaína 3 com o tecido muscular de nossos animais para avaliação dessa enzima na associação de N-3 com DEXA).

Uma outra hipótese sobre o impacto do N-3 sobre a atrofia por DEXA está sobre a quantidade de ácido araquidônico (AA) que influenciaria na expressão de prostaglandina F2 α (PGF2 α). Em nosso estudo observamos, através da cromatografia gasosa, uma diminuição na quantidade de AA de 19%, demais estudos mostraram sua capacidade de induzir maiores níveis de síntese proteica através da estimulação da produção de PGF2 α no músculo esquelético, no entanto, o uso do N-3 em modelo animal mostrou que esses ácidos graxos reduzem os níveis normais de PGF2 α em 49% e 46%, respectivamente, sendo isso

explicado pela competição de precursores de n-3 por enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides reduzindo o nível de produção de prostaglandina F2 α , pertencentes a cascata do ácido araquidônico (**Palmer e Wahle, 1987**). Em nosso estudo prévio foi demonstrado diminuição de 42,12% de AA em animais suplementados com ômega-3 em comparação com o grupo controle (**Fappi et al., 2014**) e no presente estudo observamos uma diminuição de 19% na quantidade de AA muscular. Baseados nos trabalhos apresentados, podemos sugerir, portanto, ter havido diminuição na síntese de PGF2 α e, conseqüentemente, menor síntese proteica muscular em animais já comprometidos com a administração de dexametasona, o que poderia ter potencializado os efeitos tróficos, entretanto, mais análises seriam necessárias para que se possa confirmar algum efeito do N-3 sobre a síntese muscular e níveis de PGF2-a.

O grupo N-3 isoladamente também apresentou diminuição da área de fibras do tipo 1, o que condiz com o encontrado por (**Miller, 2015**) que suplementando ratos Wistar com EPA/DHA (500mg/dia) por 40 dias constatou diminuição significativa de área das fibras musculares de gastrocnêmio em relação ao grupo CT.

Adicionalmente, **Vallette et al. (1995)** demonstraram (*in vitro*) que na presença de DHA ou AA a administração de dexametasona aumenta significativamente a transcrição de genes relacionados com a atividade do glicocorticoide (25 – 42x o nível do CT), demonstrando que ácidos graxos poli-insaturados podem ter um papel modulador intracelular na atividade do receptor de glicocorticoide. Porém, sendo essa modulação ainda pouco conhecida.

Além da atrofia muscular observada na associação de N-3 com DEXA também observamos uma alteração na proporção de fibras musculares. Com marcante redução na proporção de fibras 1 e 2A associado a um aumento em fibras 2B principalmente em animais dos grupos N-3 e DX1,25+N-3, sugerindo mudanças no programa miogênico e regeneração muscular. A conversão de fibras musculares pode ocorrer no músculo adulto por mudanças na atividade nervosa, demanda funcional ou influências hormonais (**Schiaffino e Reggiani, 2011**). Além da expressão de PGC1 α , através da via AMPK-SIRT1-PGC-1 α (**Lin et al., 2002**), uma mudança de fibra lenta para fibra rápida 1 $\rightarrow$ 2A $\rightarrow$ 2B pode ser induzida por estimulação elétrica de alta frequência que simula o disparo de neurônios motores de contração rápida, por suspensão de membros bem como por hipertireoidismo e de forma oposta, estimulação de baixa frequência, sobrecarga funcional ou hipotireoidismo estimulam a conversão de 2B $\rightarrow$ 2A $\rightarrow$ 1 (**Termin et al., 1989; Ausoni et al., 1990; Schiaffino e**

Reggiani, 2011). Em músculos de contração rápida, como o tibial anterior, há uma maior capacidade de adaptação entre fibras 2A ↔ 2B, diferente de músculos de contração lenta há uma maior capacidade $1 \rightarrow 2A \rightarrow 2B$ (**Ausoni et al., 1990**) entretanto, alterações nos hormônios tireoidianos associados com retirada de carga funcional (suspensão de membros) podem expandir a variação da conversão de fibras, aumentando consideravelmente a proporção de fibras 2B em músculos de contração lenta por exemplo (**Caiozzo et al., 1998; Schiaffino e Reggiani, 2011**).

A função tireoidiana pode ser regulada por glicocorticoides criando alterações na concentração de biomarcadores tireoidianos como TSH (*thyroid-stimulating hormone*) e TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) por exemplo, uma vez que as células tireoidianas (tireócitos) possuem receptores de glicocorticoide tipo alfa e beta (**Zhang et al., 2006; Nadolnik, 2012**). Entretanto, os grupos recebendo apenas DEXA não mostraram visível alterações de proporção de fibras como observado nos animais recebendo apenas N-3 e DX1,25+N-3, o que pode sugerir outro mecanismo. Provavelmente de forma AMPK dependente, relacionada com a expressão de PGC1 α .

Em estudo com ratos *Sprague-Dawley* fêmeas a proporção de fibras 1 em TA diminuiu significativamente em animais com lesão medular (inatividade neuronal e de carga) com aumento significativo de fibras do tipo 2B e 2X (similar a 2B), mostrando um padrão adaptação de aumento de fibras rápidas e diminuição de fibras lentas (**Zhong et al., 2007**). Baseado nisso, os grupos de nosso estudo que receberam N-3 e DX1,25-N-3 passaram por maior estado adaptativo muscular de musculatura de contração rápida, com aumento correspondente (de acordo com a literatura para tal tipo muscular) de fibras do tipo 2B. Porém, o mecanismo regulando esse efeito ainda é desconhecido, embora haja uma regulação adicional do PGC1 α relacionado com o hormônio T3 (**Wulf et al., 2008**), não temos como afirmar que alterações hormonais possam ter causado as alterações na expressão de PGC1 α que causaram o aumento da atrofia em fibras de contração lenta e maior conversão $1 - 2A - 2B$.

Possível ação anti-inflamatória potencializada pelo EPA/DHA

Um estudo recente demonstrou que a ingestão de N-3 por indivíduos saudáveis com aumento de circunferência abdominal causou uma significativa diminuição de marcadores inflamatórios séricos como: Proteína C-reativa, IL-6, IL18, TNF- α , mostrando assim um potencial efeito anti-inflamatório (**Allaire et al., 2016**). Porém, a ação de mediação do

ômega-3 como anti-inflamatório é melhor descrita pelo já demonstrado efeito inibitório sobre a via IKK/NF- κ B principalmente (Singer *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2013). O metabolismo do EPA e sua atuação em mecanismos fisiológicos favorecendo a ação anti-inflamatória é pouco focado na literatura. Fisiologicamente, o EPA está envolvido na produção de eicosanoides ímpares, prostaglandinas 3 (PGG3) e leucotrienos 5 (LT5), que possuem ação anti-inflamatória (Calder, 2006). Entretanto, deve se considerar demais interações celulares que possam resultar no aumento da ação anti-inflamatória em conjunto com glicocorticoides, com um “duplo efeito” anti-inflamatório. Uma delas seria a possível competição enzimática (enzimas elongases e desaturases) com demais ácidos graxos, favorecendo a metabolização de EPA com menor conversão de eicosanoides provindos do ácido araquidônico (AA) e ácido linoleico (AL). O alto consumo de EPA favorece sua conversão na via COX (ciclo-oxigenase) por conta de competição de receptor e pela LOX (lipo-oxigenase) desfavorecendo o AA, o que favorece a produção de fatores anti-inflamatórios, ao invés dos fatores pró-inflamatórios derivados do AA (Calder, 2006; Perini *et al.*, 2010).

De acordo com nossos resultados da cromatografia gasosa, não foi possível quantificar o EPA no músculo esquelético, podendo ter sido utilizado na conversão de eicosanoides ímpares, por exemplo. Entretanto, houve aumento na quantidade de DHA e, uma vez que o EPA é ingerido e metabolizado, um dos possíveis produtos da sua conversão pode ser o DHA, por enzimas elongases e delta-6-desaturases (Surette, 2008).

Como as cápsulas que administramos oralmente aos animais eram compostas de EPA/DHA (50:10) e observamos um aumento significativo na quantidade de DHA no músculo esquelético (GA), acreditamos que nossos resultados condizem com absorção do ácido graxo suplementado pelo tecido muscular, devido ao aumento na quantidade de DHA no grupo N-3 em relação ao grupo CT.

Expressão proteica muscular

As duas dosagens de dexametasona administradas, com ou sem suplementação prévia e concomitante de N-3, causaram diminuição significativa de Akt total, não havendo, portanto, influência do ômega-3. Porém, foi observada uma maior expressão de FoxO3a total em animais que receberam ômega-3 com dexametasona nas dosagens de 1,25 e 2,5mg/kg dia do que animais recebendo apenas dexametasona. A expressão de P-FoxO3 (Ser253), ou seja, a forma inativa do FoxO3a, foi significativamente diminuída em todos os grupos, incluindo aqueles recebendo apenas o N-3. O que indica que há uma menor proporção de

FoxO3a inativo sarcoplasmático e maior ativo, no núcleo, sendo o FoxO3a responsável pela transcrição de enzimas de degradação proteica via sistema da ubiquitina-proteasomo (Schakman *et al.*, 2009).

Não foi observada nenhuma influência do ômega-3 isoladamente ou em associação com a dexametasona sobre a expressão de Akt e GSK3 β nas formas totais além do causada pela dexametasona. Já a forma fosforilada de ambas, apenas os animais recebendo glicocorticoides mostraram diminuída expressão dessas proteínas, o que está relacionada com a inibição do glicocorticoide sobre a via do IGF-1 e sua cascata de fosforilação afetando proteínas envolvidas com a síntese proteica e manutenção da massa da fibra muscular (Bodine *et al.*, 2001b). Portanto, a influência do ômega-3 sobre a atrofia muscular não está relacionada com a expressão de Akt fosforilado ou GSK3 β , seu *downstream*. O impacto da dexametasona sobre a expressão de Akt total em relação ao grupo CT, condizendo com o observado em nosso estudo prévio (Fappi *et al.*, 2014). Estudos mostram que o Akt está associado ao complexo HSP90 e Cdc37 no qual o PI-3k é responsável pela modificação desse complexo, o que resulta na ativação do Akt. Porém, a instabilidade na ligação com o HSP90 resulta na degradação do Akt, dependente da ação das caspases e sistema ubiquitina-proteasomo (Basso *et al.*, 2002). Hipoteticamente, estando o receptor de glicocorticoide, na ausência do ligante (glicocorticoide) também associado com HSP90 (entre outras) e sendo necessária a deacetilação do HSP90 para ligação com o ligante (Vandevyver *et al.*, 1999; Kovacs *et al.*, 2005), o excesso de glicocorticoide disponível ao tecido causaria excesso de deacetilação do HSP90, entre outras chaperonas, podendo afetar demais complexos de ligação da HSP90 com outras proteínas, como o Akt; consequentemente, de forma dose X tempo dependente, ocorreria degradação secundária de Akt via caspases ou ubiquitina-proteasomo pela instabilidade do complexo HSP90-Cdc37-Akt, assim resultando na baixa expressão de Akt total observado nos grupos recebendo dexametasona. A diminuição de Akt total e fosforilado, bem como diminuição na expressão de P-GSK3 β (Ser9) e P-FOXO3 (Ser253) condiz com demais estudos (Buren *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009; Fappi *et al.*, 2014).

Já a aumentada expressão de FoxO3a total em animais recebendo DX+N3 nas dosagens de 1,25 e 2,5 mg/kg/dia foi significativa em nosso estudo, não tendo sido observada previamente por nós. Não foram encontrados dados na literatura correspondentes ao nosso estudo, em que a associação de EPA/DHA possa induzir alteração nos níveis de FoxO3 total em associação com a dexametasona. De forma oposta, trabalhos demonstram, após

administração de Ômega-3, diminuição na expressão de mRNA de *Atrogina-1/MAFbx*, *FOXO1* e 4, além de aumento na expressão de mRNA do *Akt* (**Liu et al., 2013**) e proteica de Akt e P70S6K (**You et al., 2010**). No entanto, grande parte destes trabalhos assumem grupos/modelos com quadros inflamatórios, uma vez que se sabe das propriedades anti-inflamatórias do ômega-3, o que pode influenciar o resultado positivo pelas suas propriedades.

De maneira similar ao realizado por nós neste projeto, **Le Foll et al., (2007)** realizaram um estudo com os grupos CT, N3, DX e DX+N3, visando avaliar a interação do N-3 com dexametasona na sinalização da insulina em diferentes tecidos. A associação do N-3 com a dexametasona causou um impacto significativo na fosforilação de Akt e isoladamente o N-3 causou diminuição significativa na expressão da subunidade p85 α do PI-3k muscular e do tecido adiposo, prejudicando a sinalização da insulina (**Le Foll et al., 2007**). Entretanto não observamos alterações significativas na fosforilação do Akt.

A via Ras/Raf/MEK/ERK na associação Ômega-3 com dexametasona

A via MAPK, que inclui o ERK1/2, está relacionada na fibra muscular na ativação de diversos fatores de transcrição gênica ativando muitos substratos como o p90RSK (p90 ribossomal S6 kinase), eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) o que direciona a fibra a se diferenciar em fibras lentas (**Williamson et al., 2003**), entretanto, havendo diferença sobre o momento de maturação da fibra muscular, tendo, dessa maneira, diferente função (**Rommel et al., 1999**). No estudo de **Williamson et al. (2003)** com uma amostra com homens jovens e idosos, o estado de fosforilação do ERK1/2 em jovens é significativamente menor que comparado a idosos, e após exercícios de resistência o estado de fosforilação do ERK2 aumenta em jovens e diminui em idosos, mostrando a diferente atuação na idade do indivíduo. **Gredinger et al. (1998)** demonstraram *in vitro* por inibição direta da via MAPK bloqueou a expressão de MyoD, demonstrando assim um papel de miogênese na fibra muscular.

Em nosso estudo os animais controles e do grupo N-3, apresentaram um estado de fosforilação de ERK1/2 elevado frente a animais recebendo glicocorticoides que afetou significativamente sua fosforilação (P-ERK1), sem influência do ômega-3 nessa alteração, demonstrando, assim um papel de inibição da miogênese pela dexametasona em ratos.

Em estudo de atrofia muscular por suspensão de membro em ratos houve diminuição de P-ERK1/2 (**Marzuca-Nassr et al., 2016**), mostrando que o estado de atrofia muscular

inibe a via MEK/ERK, adicionalmente, o mesmo estudo demonstrou que o EPA não influencia a expressão de P-ERK1/2 ou total. O que condiz em parte com nosso estudo.

Segundo o estudo de **Zheng *et al.* (2010)** em células L6, a administração de DEXA por 48hs conduziu a uma maior atividade de FOXO3a que estaria relacionada com maior ativação de IRS-2 (substrato de receptor responsável pela ativação da via Ras/Raf/MEK/ERK) o que levaria a maior atividade da via e produção de ubiquitinas C (*UbC*) e levando à atrofia muscular, tendo portanto uma participação recíproca entre FOXO com a via IGF-1 e MEK/ERK. Em nosso estudo observamos uma expressão diminuída de *IRS-2* (mRNA) associado com menor expressão de P-ERK (Thr202/204) e P-FOXO3a (Ser253), quando, de acordo com o estudo **Zheng *et al.*, (2010)** a baixa fosforilação de FOXO3a deveria ter levado a uma alta expressão de *IRS2* e P-ERK. Esse efeito pode estar relacionado com a maturidade do músculo e tipo de estudo, tratando-se de um animal adulto em comparação à um estudo *in vitro*.

Via Miostatina/Smad2/3 na associação de ômega-3 com dexametasona

A via de sinalização da miostatina está relacionada com regulação negativa da massa muscular, em contrapartida aos efeitos tróficos da via do IGF-1, sua ativação através da interação com o Smad2/3, principalmente ativada na administração de glicocorticoides, conduz a uma inibição no crescimento muscular associado a maiores níveis de degradação proteica através da transcrição nuclear de componentes do sistema de degradação da ubiquitina-proteasomo, como Atrogina-1 e MURF-1 (**Wang *et al.*, 2016**). Em estágios iniciais à administração de glicocorticoides os níveis de Miostatina se encontram altos, porém, diminuem a partir do 5 dia *in vivo* restabelecendo seus padrões normais (**Ma *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2016**). Em nosso estudo avaliamos a expressão de P-Smad2/3 e observamos que em associação com o ômega-3, os grupos recebendo dexametasona, DX2,5+N-3 apresentaram alta expressão de P-Smad3, indicando um efeito prolongado/tardio sobre a via da miostatina/Smad2/3. Adicionalmente a expressão de mRNA para *Atrogina-1* e *MURF-1* foram maiores nesse grupo em comparação ao grupo DX1,25+N-3, compatível com a maior expressão proteica de P-Smad2/3.

Autofagia na administração de glicocorticoides e a influência do Ômega-3

A atrofia por glicocorticoides se configura por um estado muscular com alteração do metabolismo proteico acarretando a diminuição da taxa de síntese proteica frente a um

aumento de degradação, levando assim o músculo ao estado de catabolismo (**Pereira e Freire de Carvalho, 2011**). Nesse modelo de atrofia muscular se observa a ativação de diferentes sistemas de degradação, como o sistema ubiquitina-proteasomo, calpaínas e o sistema lisossomal (**Hasselgren, 1999; Schakman et al., 2013**). Um dos principais mecanismos da ativação lisossomal por glicocorticoides se dá pela inibição da sinalização da via do IGF-1/PI-3K/Akt/mTOR que diminui a ativação do mTOR, proteína com ação supressora sobre proteínas relacionadas com a formação de membrana lisossomal, como a ULK1 quinases (*autophagy-initiating UNC-5 like autophagy activating kinase*) e AMBRA1 (*autophagy/beclin 1 regulator 1*) tendo, portanto, regulação parcial da autofagia celular, entretanto, ainda não se sabe completamente como ocorre a ativação lisossomal “mTOR-dependente” (**Kim e Guan, 2015**), porém, sabe-se que a inibição do mTOR, pela administração da rapamicina por exemplo, não é tão eficaz quanto a ativação lisossomal pela inibição do Akt (**Mammucari et al., 2008**) havendo, portanto, mais mecanismos em processos anteriores a ativação do mTOR relacionados com ativação autofágica, possivelmente pelo Akt/TSC's, entretanto, ainda não se sabe ao certo o papel da autofagia induzida pelos glicocorticoides.

Para determinação de estado autofágico/lisossomal celular algumas proteínas são utilizadas como marcadores para os diferentes processos de autofagia, sendo os mais comumente utilizadas o LC3-I e LC3-II, que são moléculas ubiquitina-like que a partir da conjugação com Atg7, durante o processo autofágico ativo, são convertidas de um estado inicial LC3-I (citossólica) para LC3-II, estando o LC3-II presente em estruturas autofágicas incluindo fagóforos, autofagossomos e autolisossomos, sendo os níveis de LC3-II ou a relação LC3-II/I por *western blotting* correlacionados com a nível de formação de autofagossomo (vesículas de dupla-membrana), sendo após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, degradada (**Xie e Klionsky, 2007; Mammucari et al., 2008; Glick et al., 2010; Ju et al., 2010**). E a proteína p62/SQSTM1, ou P62, um molécula de adaptação envolvida na seleção de agregados proteicos para degradação via autofagossomo, se ligando simultaneamente ao LC3 e proteínas ubiquitinadas, uma vez que a P62 é constantemente removida na autofagia, sendo degradada no processo autofágico, ela se torna um bom marcador da atividade lisossomal e renovação de vesículas autofágicas (**Kirkin et al., 2009; Klionsky et al., 2012**).

No presente estudo a administração de DEXA ocasionou um aumento na expressão muscular de LC3-I e LC3-II em ambas as dosagens administradas e na associação com o N-

3 observou-se um aumento significativo na expressão de LC3-II, P62 e na razão de LC3II/LC3-I em comparação aos grupos recebendo somente DEXA.

Demais estudos, como o estudo de **Giron et al. (2015)** a administração de DEXA (0,1mg/kg/dia) por 21 dias *in vivo* (ratos Sprague Dawley) ocasionou aumento significativo na expressão proteica de LC3-II, P62 e expressão de mRNA de Bnip3 (gene indutor da formação de autofagossomos) no músculo esquelético, sendo atenuado pela administração prévia e concomitante de β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB – metabólito da Leucina) através de mecanismos envolvendo a ativação de Akt e inibição do FOXO3a.

No estudo de **Troncoso et al. (2014)** a administração de DEXA *in vitro* (miócitos de rato - L6) aumenta a expressão de genes relacionados com a autofagia como TG5, LC3, BECN1, e SQSTM1, bem como expressão proteica de LC3-II e razão LC3-II/LC3-I. Tal observação associado à administração de silenciador para inibição da fragmentação mitocondrial (Mdivi-1) mostrou que a autofagia associada ao DEXA está parcialmente direcionada para fragmentação (*clearance*) mitocondrial de forma AMPK-dependente, auxiliando o processo de atrofia muscular e adaptação muscular ao estresse como um controle de qualidade mitocondrial. O mesmo foi observado no estudo de **Hudson et al. (2014)** em que a administração de DEXA *in vitro* (C2C12) ocasiona aumento da expressão de LC3 (mRNA).

Já no estudo de **Yamamoto et al. (2010)** o aumento da expressão de LC3II *in vivo* pela administração de DEXA (600ug/Kg) por 5 dias foi atenuado pela administração concomitante de BCAA (*branched-chain amino acids*), estando provavelmente relacionada pela maior disponibilidade de aminoácidos e ativação de mTOR.

A administração de N-3 e a avaliação autofágica têm sido muito realizada atualmente, por conta da sua relação recentemente descoberta com a modulação da autofagia, entretanto não tendo sido avaliada no tecido muscular esquelético. No estudo de **Kim et al., 2018**, a administração de N-3 *in vivo* e *in vitro* aumentou significativamente a citotoxicidade celular de modelo de células tumorais gliais (D54MG, U87MG, U251MG e GL261) estando relacionado com aumento da expressão proteica de LC3-II, com diminuição da fosforilação e ativação de Akt/mTOR com aumento da fosforilação de P-AMPK, sinalizando portanto aumento de autofagia e apoptose (**Kim et al., 2018**). Em tecido renal (estudo de isquemia-reperfusão) o acúmulo de N-3 local aumentou os níveis proteicos de LC3-II, Beclin-1 e Atg7 associado com maior expressão de AMPK e menor de P-mTOR (**Gwon et al., 2017**). Demais tecidos/tipos celulares em que há aumento da autofagia relacionada com o uso de N-3:

sistema imune/macrófagos (Shen *et al.*, 2017); sistema nervoso central(SNC)/microglia (Inoue *et al.*, 2017); ocular/células ARPE-19 (Koskela *et al.*, 2016); SNC/ células de Purkinje (Bak *et al.*, 2015); pulmonar/ células A549 (Yao *et al.*, 2015); Medula óssea/células mBMMSC (Gao *et al.*, 2016). No estudo de Gao *et al.* (2016) realizou-se a associação de DEXA com N-3 (EPA) e foi demonstrado – da mesma forma que nosso estudo – que a associação de DEXA com N-3 aumenta significativamente a autofagia celular, segundo os autores, sendo modulado pelo receptor GPR120 e aumento da ativação de AMPK/mTOR, entretanto, mesmo bloqueando o GPR120 , AMPK e mTOR ainda não foi possível bloquear completamente a autofagia causada pelo DEXA, havendo ainda mecanismos não elucidados da sua atuação.

Expressão de mRNA

O REDD1/2 (*regulated in development and DNA damage responses 1/2*) é um componente recentemente relacionado com resposta ao estresse, mas inicialmente descoberto como um gene ativado por hipóxia e dano ao DNA, atualmente sabe-se de sua ativação relacionado ao estresse energético, uso de glicocorticoides e espécies reativas de oxigênio (Ellisen *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2009). Durante o processo de atrofia muscular, induzido por diferentes mecanismos, há um aumento da degradação muscular associado a uma inibição de síntese muscular, levando o tecido a um estado atrofico. Um dos processos de inibição de síntese proteica muscular se dá pela repressão do mTORC1 (*mTOR complex*, composto pelo mTOR, Raptor, MLST8, PRAS40 e DEPTOR) de forma Akt-dependente, impedindo a sequência de ativação (*downstream*) do mTOR (P70S6K e 4EBP1) o que leva a uma na fase de iniciação da tradução de mRNA (Brugarolas *et al.*, 2004; Bentzinger *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2013).

Um dos meios de inibição da atividade mTORC1 ocorre pela ação dos REDD's (REDD1 e REDD2) - produzidos a partir do fator de transcrição FOXO3 - que inibem a ação do Rheb na ativação do mTOR (Kelleher *et al.*, 2015). Os glicocorticoides conduzem o tecido a eventos de inibição da resposta ao IGF-1 e a insulina, o que acarretam a aumento da atividade dos FoxO's e, conseqüentemente, aumento na transcrição de REDD1 e 2 (Schakman *et al.*, 2013).

Estudos diversos mostram que administração de DEXA *in vitro* eleva significativamente a expressão de REDD1 com diferente expressão de REDD2. No estudo de Tsuchida *et al.* (2017) a administração de DEXA *in vitro* (C2C12) elevou a expressão de mRNA de REDD1 nas primeiras 4-5 hs, entretanto, com normalização após 24hs, sem

aumento da expressão de *REDD2*. Já o trabalho de **Nishida et al. (2015)** mostrou que a administração de DEXA (0,6mg/kg/dia) por 5 dias causou aumento significativo na expressão de *REDD-2*, sem alteração da expressão de *REDD-1*, indicando um possível efeito tempo-dependente da ação de REDD's no tecido muscular esquelético. O que pode ser novamente observado no estudo de **Britto et al. (2014)** em que a administração de DEXA em dose única de 0,2 ou 1 mg/kg/dia *in vivo* mostrou expressão proteica e de mRNA elevada de REDD1 após 5hs da administração e mostrando expressão normal 24hs após a administração. Demais estudos com avaliação precoce de *REDD-1* e 2 mostram efeito similar, com baixa expressão inicial de *REDD-2* com alta de *REDD1* (**Wang et al., 2006**).

Em nosso estudo, a administração de DEXA isoladamente por 10 dias (doses de 1,25 e 2,5 mg/kg/dia) significativamente aumentaram a expressão de *REDD-2*, sem aumento significativo na expressão de *REDD-1*, condizendo com o estudo de **Nishida, et al.** No entanto, a alta expressão de *REDD-1* na associação de DX2,5+N-3 mostra um prolongamento na expressão deste mRNA qual deveria, segundo estudos citados, ter se normalizado aos 10 dias de estudo, portanto, o tecido muscular desses animais deve mostrar reduzida atividade de síntese proteica, o que está de acordo com o observado na expressão de MYOD no mesmo grupo, com diminuição significativa frente ao grupo CT e o grupo DX2,5.

O mecanismo pelo qual o N-3 pode influenciar a expressão de *REDD-1/2* ainda é desconhecida e um dado novo na literatura e deve ser mais bem estudado.

Atrogina-1/MAFBX, MuRF-1 e Miostatina

Sabe-se que a administração de glicocorticoides induz a um aumento na expressão de Miostatina com consequente aumento na expressão proteica e gênica das enzimas E-3 ligases Atrogina-1/MAFBX e MuRF-1, mediadas pelo FOXO3a e Smad2/3, conduzindo ao início do processo de atrofia muscular (**Bodine et al., 2001a; Schakman et al., 2008; Schakman et al., 2009; Schiaffino et al., 2013**).

Porém, a resposta da expressão de *Miostatina* pela dexametasona pode ser além de dose-dependente, tempo-dependente. No estudo de **Ma et al. (2003)** animais que receberam dexametasona em diferentes dosagens por 5 dias apresentaram aumento na expressão de *Miostatina* (mRNA) proporcional a dose administrada de droga, entretanto, em animais recebendo as mesmas dosagens por 10 dias não houve nenhum aumento. Em nosso estudo apenas animais recebendo DX1,25 mostraram aumento significativo da *Miostatina* o que

sugere que após 10 dias, em doses maiores de DEXA, os níveis de mRNA de *Miostatina* possivelmente se normalizam. Os autores, com uso de antagonistas do receptor de glicocorticoide (RU-486), restauraram a expressão de *miostatina*, demonstrando que sua expressão era dependente do receptor de glicocorticoide.

No estudo de **Han et al. (2017)** a administração de DEXA *in vitro* (C2C12) em diferentes dosagens mostrou que em dosagens menores houve aumento significativo da expressão de *Miostatina* se normalizando em doses elevadas e, de forma similar, o estudo de **Wang et al. (2016)**, *in vitro*, mostra que a expressão de *Miostatina* é maior em momentos iniciais (até 24hs) e menor a partir de 36hs da administração. Demais estudos *in vivo* demonstram o mesmo, uma expressão elevada de *Miostatina* entre 3 – 7 dias de administração de DEXA com retorno ao basal após alguns dias (**Ma et al., 2003; Macedo et al., 2016**) vale destacar que a maior perda de massa muscular ocorre justamente nesse período entre 3 – 7 dias, estando a expressão de *Miostatina* relacionada com o mesmo período e sendo um regulador negativo da massa muscular, considera-se esse evento coerente. Entretanto, **Dong et al. (2013)** demonstraram que a expressão da *Miostatina*, após 14 dias de DEXA (5mg/kg/dia), ainda não havia se normalizado, entretanto, com níveis menores em comparação ao início do tratamento com DEXA.

De forma oposta ao descrito até o momento, **Kim et al. (2015)**, usando uma dosagem de 1mg/kg/dia por 10 de dexametasona, dosagem similar ao nosso grupo de menor dosagem, observaram aumento significativo na expressão de *Miostatina* no 10º dia de estudo, o que corrobora com nosso estudo para a dose de 1,25mg/kg/dia de DEXA.

A expressão de *Atrogina-1* no grupo de associação DX2,5+N-3 foi significante aumentada em comparação ao grupo recebendo apenas DX2,5, sendo esse dado similar ao que observamos em nosso estudo prévio (**Fappi et al., 2014**) usando a dosagem de 5 mg/kg/dia.

Demais estudos demonstram que o N-3 de forma isolada não causa aumento da expressão de *Atrogina-1* (**Marzuca-Nassr et al., 2016**), porém, não havendo estudos de associação N3+DX, não sendo possível uma comparação entre estudos.

Os receptores de insulina e IGF1 são proteínas tirosina quinases que fosforilam várias proteínas, através de uma cascata de sinalização, incluindo os substratos do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2, que desempenham um papel fundamental na homeostase do músculo, no metabolismo da glicose, na ativação da sinalização e limitação de Akt / mTOR e ativação da via AMPK (**Long et al., 2011**).

No entanto, **Zheng et al. (2010)** demonstraram que o aumento da expressão de IRS-2 por FOXOs, conseqüentemente, leva a um aumento na expressão de Ras/Raf/MEK/ERK relacionada aos níveis de sarcoplasma de UbC mais altos pela ação do FOXO.

Em nosso estudo, demonstramos que DX, DX+N-3 ou administração de N-3 isolada podem diminuir a expressão de mRNA do *IRS-1* o que é consistente com o padrão observado nos resultados de P-Akt, P-FOXO3a. No entanto, **Oh et al. (2010)** demonstraram que N-3 pode melhorar a sensibilidade da insulina muscular no modelo de camundongo obeso, de forma dependente de GPR120, uma vez que os ratos GPR120 KO não mostraram melhora do óleo de peixe suplementação, e **Hu et al. (2014)** demonstraram que o EPA podem restaurar os níveis de mRNA de IRS-1 em um modelo diabético. Em condições não-patológicas como demonstrado por **Taouis et al. (2002)** em ratos, a dieta de N-3, apesar de induzir significativa diminuição na expressão de mRNA de *P85- α* (subunidade do PI-3K), a expressão de IRS-1 permanece na resposta normal.

6.2. Comparação entre glicocorticoides

As dosagens de DEXA administradas (2,5 e 1,25mg/kg/dia) causaram, de maneira similar, perda de peso corporal, bem como muscular (GA e TA) e adrenal. Entretanto, comparado aos demais glicocorticoides, em dosagem equipotente, observou-se que a metilprednisolona (MP) na dosagem de 13mg/kg/dia foi mais prejudicial ao peso corporal e muscular em comparação com a DEXA e deflazacorte (DC). Entretanto, segundo outro estudo, o DC mostrou-se mais prejudicial que a MP, ambos em baixas dosagens (0.5/mg/kg/dia por 6 semanas) o que resultou em menor peso corporal e muscular (GA) em animais recebendo DC e não MP (**Dekhuijzen et al., 1995**).

Em altas doses (80mg/kg/dia) como no estudo de **Nava et al. (1996)** a MP afeta significativamente o peso corporal (a partir de 3 dias pós administração da droga) e muscular (GA) ao fim de 5 dias de administração. Portanto, há influência da dose administrada nos efeitos musculares relacionados com ambas as drogas.

No estudo de **Dekhuijzen et al. (1995)** foi observado que o DC, além de diminuição de peso corporal/muscular causa adicionalmente atrofia muscular em fibras 1, 2A e 2B (GA) em comparação com a MP e CT, lembrando que foi utilizada baixa dosagem (0.4mg/kg/dia por 6 semanas) e utilizamos 20 e 10 mg/kg/dia. No referido estudo, os autores correlacionam a diminuição na área das fibras observada com o baixo peso corporal observado nesses animais durante o estudo, que pode ter influenciado os resultados. No estudo de **Yoshimura**

et al. (2007) observou-se extensa atrofia muscular de diversos músculos esqueléticos em cães *beagles* saudáveis após a administração de 0.9mg/kg/dia de deflazacorte (3 meses) (Yoshimura *et al.*, 2007). Em nosso estudo o deflazacorte administrado na dosagem de 10mg/kg/dia (grupo DC10) foi o causou menor perda de peso pré e pós droga (15,5%), entretanto, causou maior atrofia muscular em fibras do tipo 1 em relação ao seu grupo comparativo de maior dosagem (DC20) e MP6. Considerando que não houve perda de peso excessiva que possa ter influenciado tais resultados, fica claro em nosso estudo que o DC em menores dosagens impacta menos sobre fibras do tipo 2B do que a MP e DEXA, porém, da mesma forma que a DEXA, afeta mais fibras do tipo 1. Este achado poderia estar relacionado com a maior inibição de calpaína em altas dosagens, recapitulando os trabalhos já previamente discutidos, porém, tendo efeito “fibra específica”, uma vez que esse efeito só foi observado em fibras do tipo 1 em nosso estudo e na musculatura diafragmática por demais autores (Maes *et al.*, 2008; Maes *et al.*, 2010) que é uma musculatura com grande proporção de fibra oxidativa.

Em relação ao peso da glândula adrenal, em nosso estudo, o DC na dosagem de 10 mg/kg/dia e a MP na dosagem de 6,7 mg/kg/dia por 10 dias, não influenciaram negativamente seu peso em relação ao CT, como ocorre com a dexametasona em dosagem de 1,25mg/kg/dia, sendo, portanto, a dexametasona mais lesiva ao trofismo da glândula adrenal do que demais glicocorticoides possivelmente devido à atividade inibitória sob o CRH (Hormônio liberador da corticotrofina) (Karatsoreos *et al.*, 2010; Pey *et al.*, 2012). Porém, altas doses de ambas as drogas influenciam de forma similar o peso adrenal em comparação à dexametasona. No estudo de Dekhuijzen *et al.* (1995) a administração de baixa dosagem de DC (0,5 mg/kg/dia), por 6 semanas, foi suficiente para diminuição significativa no peso da glândula adrenal de ratos em relação a controles ou ratos recebendo MP na dosagem de 0,4 mg/kg/dia. O que indica que baixas dosagens de DC e MP não influenciam o trofismo adrenal até 10 dias de administração em baixas dosagem, porém afetam significativamente seu trofismo se administradas de forma crônica em ratos.

Nava *et al.*, (1996) observaram diminuição significativa no peso da glândula adrenal de ratos recebendo MP na dosagem de 80mg/kg/dia por 7 dias, sendo essa diminuição de $\approx$ 25% (Nava *et al.*, 1996). Entretanto, em nosso estudo, observamos diminuição de 47,8% no peso da adrenal do grupo MP13 (13,3mg/kg/dia por 10 dias) em comparação ao grupo CT, quase o dobro do observado pelos autores.

O DC é estudado desde 1980 e têm sido demonstrados diversos fatores que o classificam como mais seguro comparado a demais glicocorticoides com base em

propriedades farmacológicas tais como menor excreção de cálcio e hidroxiprolina (aminoácido presente no colágeno e abundante na matriz óssea), menor efeito sobre a regulação da glicose e degeneração neuronal (**Gonzalez-Perez *et al.*, 2007**), menor efeito sobre metabolismo ósseo (**Kasperk *et al.*, 1995**) e auxílio na prevenção de acúmulo de gordura corporal e de retardo do crescimento corporal (**Ferraris *et al.*, 2000**). Entretanto, poucos estudos avaliam o deflazacorte do ponto de vista molecular em espécimes saudáveis, sendo nosso estudo mais exploratório nesse ponto de vista. Vale destacar que o Deflazacorte é um medicamento utilizado na prática médica prescrito principalmente para o tratamento da Distrofia muscular de Duchenne (DMD) e, embora traga maior tempo de deambulação ao pacientes tratados, em contrapartida, está associado com maiores efeitos colaterais em comparação com a prednisona/prednisona (**Bello *et al.*, 2015**), tendo sido liberado para uso nos EUA apenas em fev./2017 para tratamento de DMD (nota da FDA disponível em <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm540945.htm>).

Expressão de proteínas, via do IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR

Quanto a expressão de Akt total considerando diferentes glicocorticoides, apenas a dexametasona (grupos DX1,25 e 2,5) foi capaz de causar diminuição significativa na expressão de Akt em comparação ao CT. Já na forma fosforilada todos, exceto o grupo MP13, mostraram redução significativa de expressão em comparação ao grupo CT.

Já a expressão de GSK3 β total mostrou-se elevada em animais do grupo DC20, o que está de acordo com o descrito na literatura sobre o aumento da expressão de GSK3 β após a administração de glicocorticoides (**Verhees *et al.*, 2011**). Já a expressão de sua forma fosforilada foi reduzida nos grupos recebendo DX1,25, MP6 e DC20, de forma similar ao observado na expressão de P-AKT. Sabe-se que o Akt, uma vez ativado pelo IGF-1 por fosforilação (cascata de fosforilação dependente de fosfatidil), acarreta ativação/inibição de diversas proteínas, atuando na ativação do mTOR, relacionado com aumento da síntese proteica, e na inibição do GSK3 β , relacionado com o metabolismo da glicose e ação da insulina, o que desfavorece a síntese muscular (**Jefferson *et al.*, 1999; Bodine *et al.*, 2001b; Leger *et al.*, 2006; Ciaraldi *et al.*, 2010; Gundersen, 2011**).

A administração de glicocorticoides impacta diretamente sobre a via do IGF-1, causando efeitos inibitórios sobre a via e a fosforilação do Akt, o que acarreta aumento da degradação e diminuição da síntese proteica, sendo isso bem descrito na literatura (**Schakman *et al.*, 2013; Schiaffino *et al.*, 2013**).

A expressão de P-FOXO3a bem como a razão de P-FOXO/FOXO total na fibra muscular mostrou-se diminuída em todos os grupos recebendo glicocorticoides, sem haver diferença entre os grupos o que se relaciona com diminuição na ativação da via do IGF-1 (Schakman *et al.*, 2013).

A expressão de P-ERK1/2 mostrou-se diminuída nos grupos recebendo MP em comparação aos demais glicocorticoides em dose equipotente, mostrando menor potencial de redução da miogênese em comparação aos demais glicocorticoides. Estudos mostram que os glicocorticoides possuem efeito de diminuição do influxo de Ca^{++} intracelular em menor ou maior grau dependendo do glicocorticoide (Passaquin *et al.*, 1998) entretanto, não há estudos comparando os três glicocorticoides quanto ao influxo do Ca^{++} porém sabe-se que seus níveis podem influenciar de forma positiva a sinalização da via Ras/Raf/MEK/ERK (Agell *et al.*, 2002). Baseado nisso, podemos supor que a diminuição da expressão e P-ERK1/2 observada na administração de MP pode ter se dado por alterações no nível de cálcio sarcoplasmático, o que acarretaria em maiores prejuízos a miogênese em relação aos demais glicocorticoides, o que condiz com o observado na expressão de mRNA, sendo o MP6 o único grupo apresentando diminuição significativa na expressão de *MYOD*, entretanto, com maior expressão de *MYOG*, e alterações na proporção de fibras musculares, estando o ERK1/2 relacionado com síntese proteica e manutenção de fibras (Shi *et al.*, 2008).

A expressão de Smad2/3 total, bem como nas formas fosforiladas foi elevada nos grupos recebendo MP e DC por 10 dias em relação ao grupo DEXA. Como a expressão da via Miostatina/Smad2/3 se dá em momentos iniciais e se normaliza em geral nos primeiros dias (Ma *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2016), e tendo tido a dexametasona efeitos mais pronunciados sobre a via do IGF-1 (expressão de AKT e P-AKT), podemos supor que a expressão observada de P-Smad2/3 elevada nos grupos recebendo demais glicocorticoides, que não a dexametasona, se deu por mecanismo de atraso na expressão e “ativação” da via Miostatina/Smad2/3 pela forma que ainda está expressa após 10 dias de administração de glicocorticoides. No entanto, encontramos dificuldades em encontrar trabalhos que façam comparações similares avaliando expressão proteica muscular esquelética de Smad2/3 mesmo com o uso de DEXA, glicocorticoide comumente usados para indução de atrofia muscular em modelo animal.

Expressão de mRNA

Como citado previamente, a expressão de *REDD1* e 2 possuem tempo-dependência de exposição do músculo ao glicocorticoide e, recapitulando o observado em nosso estudo, todos os grupos de animais recebendo qualquer droga/dose mostraram expressão elevada de *REDD2*, entretanto, na expressão de *REDD1* apenas animais dos grupos recebendo MP tiveram aumento significativo em comparação aos demais grupos.

Estudos mostram que a administração de DEXA *in vitro* elevou a expressão de mRNA de *REDD1* nas primeiras horas se normalizando após 24hs, não apresentando nenhum aumento da expressão de *REDD2* (Wang *et al.*, 2006; Britto *et al.*, 2014; Tsuchida *et al.*, 2017). Entretanto, em prazo mais longo estudos mostraram que a administração de DEXA por 5 dias causa aumento significativo na expressão de *REDD-2*, sem alteração da expressão de *REDD-1* (Nishida *et al.*, 2015).

Um achado interessante descrito por (Frost *et al.*, 2009) foi que a administração de IGF-1 (*in vitro* e *in vivo*) causou aumento da expressão de REDD1 (mRNA e proteína) contudo, sem afetar a síntese de proteína. Sendo esse dado ainda não elucidado, mas provavelmente porque o IGF-1 causa ativação de mais complexos proteicos que podem resultar na expressão de REDD1 precoce. Da mesma forma os animais do grupo MP mostram maior expressão de REDD1 associado com maior expressão de *MYOG* sendo isso não elucidado.

A expressão de *Miostatina* mostrou-se menor em grupos recebendo altas dosagens de DX e DC, entretanto, o que pode estar de acordo com a dose/tempo-dependência de exposição de glicocorticoide ao tecido (Ma *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2016). Na expressão de *MURF-1* todos os grupos mostraram aumento significativo de sua expressão, exceto nos grupos recebendo DC, padrão similar foi observado na expressão de *Atrogina-1*, tendo os grupos DC10 e DC20 significante menor expressão em relação aos demais grupos em dosagem equipotente o que aponta para um efeito mais brando sobre a expressão de atrogenes pelo DC, embora tenhamos observado expressão similar de P-FOXO3a entre os grupos (fator de transcrição responsável pela tradução do mRNA de atrogenes), todavia a expressão gênica e proteica de atrogenes pode mostrar resultados diferentes, como já observado em outros estudos (Wang *et al.*, 2016).

A expressão de *IRS-1* foi somente afetada pela DEXA de modo significativo em relação aos demais glicocorticoides, o que indica somente a DEXA (1,25 e 2,5 mg/kg/dia

por 10 dias) acarreta prejuízos significantes à sinalização da insulina e do IGF-1 por meio de substrato de receptor, diferente dos demais glicocorticoides, que trouxeram efeitos similares de atrofia muscular e expressão de atrogenes sem afetar a expressão do *IRS-1*.

Demais estudos já demonstraram que a DEXA é capaz de diminuir a sinalização do *IRS-1* por meio da competição do receptor de glicocorticoide ativo pelo substrato do receptor da insulina P85 α que prejudica a sinalização da insulina e ao IGF-1 e causa diminuição nos níveis de *IRS-1* (Kuo *et al.*, 2012). Entretanto, esperávamos que tivesse havido um aumento na expressão de *IRS-2*, baseado em trabalhos como o de Zheng *et al.* (2010), em que a administração de glicocorticoides aumenta a expressão de *IRS-2* e consequentemente leva a um aumento da expressão de proteínas da via ras/raf/MEK/ERK e UbC's, no entanto, com exceção do grupo MP13, observamos o oposto, uma diminuição na expressão de *IRS-2* associado com diminuição geral na expressão de P-ERK1/2, mostrando mais uma vez a contraversão sobre a função da via MEK/ERK no músculo adulto ou jovem, *in vitro*, *in vivo*, entre espécies, etc.

Considerações finais

Dessa forma, concluímos que a suplementação prévia e concomitante de ômega-3 associada com dexametasona por 10 dias conduz maiores prejuízos musculares (sugerindo reação adversa da associação entre esse tipo de PUFA e a dexametasona) através de mecanismos diversos que envolvem uma maior ação do sistema autofágico-lisossomal associado com prejuízos na sinalização MAPK-PGC1 α e IGF-1 constituindo cenário para maior expressão de FoxO's e Atrogenes.

Comparando diferentes glicocorticoides, a metilprednisolona e o deflazacorte são menos lesivas ao eixo HPA que em comparação a dexametasona e nenhum dos glicocorticoides afetam fibras 2A, entretanto, todos afetam fibras 2B, com menor impacto do deflazacorte a 10mg/kg/dia. A dexametasona é mais lesiva a via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR, afetando principalmente o Akt em sua forma fosforilada e total, proteína também relacionada com a captação de glicose por GLUT4. Entretanto, a metilprednisolona é mais prejudicial que demais glicocorticoides sobre a via Ras/Raf/MEK/ERK e *REDD-1*, bloqueador direto do mTOR relacionada com diferenciação e proliferação celular e síntese proteica muscular através de fatores de iniciação ribossômicos.

Desta forma, objetivando dar continuidade na elucidação dos mecanismos observados aqui pela suplementação de EPA/DHA, e considerando seu potencial papel na autofagia, uma importante contribuição científica seria estudar a relação da suplementação de N-3 no

desenvolvimento da atrofia muscular com a ação sobre o receptor GPR120, e consequente ativação da via $\text{AMPK} \rightarrow \text{TORC2} \rightarrow \text{PGC1}\alpha$. Além de avaliar os efeitos sobre o sistema de calpaínas e autofagia. O silenciamento gênico para GPR120, canais de Ca^{++} , calpaína, AMPK e componentes da autofagia nos daria melhor compreensão dos mecanismos acerca da atuação do N-3 na atrofia mediada por dexametasona ou ainda na associação da administração do N-3 sobre condições patológicas em doenças de armazenamento lisossomal, como a sialidose.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- A administração de ômega-3 (EPA100 mg/kg/dia) prévia e concomitantemente com dexametasona nas dosagens de 2,5 ou 1,25 mg não influencia a perda de peso corporal, muscular ou da suprarrenal dos animais. Comparando diferentes glicocorticoides, a metilprednisolona é a que causa maior redução de peso corporal em comparação a outros glicocorticoides (dexametasona e deflazacorte).
- A suplementação prévia e concomitante de ômega-3 (EPA/DHA) pode aumentar a atrofia muscular de fibras 1 e 2A em animais recebendo dexametasona, associado com maior expressão de receptor total de glicocorticoide, LC3II, P62, P-Smad2/3, FOXO3a total, ERK total, *Atrogina-1* e *REDD-1* e menor expressão de ácido araquidônico, PGC1- α , *MYOD* e *MOYG*.
- O ômega-3 isoladamente pode causar diminuição de área de fibras do tipo 1, menor expressão de PGC1- α , P-FOXO3a, ácido araquidônico e *IRS-1*, indicando efeitos isolados sobre a via IGF-1 e AMPK/PGC1- α .
- Comparando diferentes glicocorticoides, o deflazacorte e a metilprednisolona (10 e 6,7mg/kg/dia, respectivamente) causam menor impacto ao eixo HPA por 10 dias em ratos em relação à dexametasona.
- O deflazacorte em dosagem de 10 mg/kg/dia causa menor impacto à fibra 2B em relação aos demais em dose equipotente, entretanto, causa atrofia em fibras do tipo 1 similar à dexametasona.
- Glicocorticoides, de forma isolada, não acometem fibras do tipo 2A mesmo em altas dosagens em ratos.
- A dexametasona causa diminuição da expressão de Akt total bem como fosforilado após 10 dias de sua administração com aumento da expressão de GSK3 β total e similar diminuição do P-GSK3 β . Comparando diferentes glicocorticoides, a dexametasona é a que mais prejudica a expressão de Akt total e de P-AKT em comparação a demais glicocorticoides em dose equipotente.
- A dosagem de DC20 por 10 dias em ratos pode aumentar a expressão de FOXO3a total e P-Smad2/3 em relação a demais glicocorticoides, mas igualmente afetada na expressão de P-FOXO3a.
- A administração de metilprednisolona por 10 dias causou maior impacto sobre a via ras/raf/MEK/ERK e expressão de *IRS-2* em comparação a demais glicocorticoides em dose equipotente após 10 dias de administração.

- A metilprednisolona (6,7 e 13,3 mg/kg/dia) por 10 dias mantém a expressão de *REDD-1* e *MYOG* significativamente alta em relação à demais glicocorticoides.
- Glicocorticoides afetam igualmente a expressão de *REDD-2* muscular após administração crônica (10 dias) em ratos.
- A expressão de *Miostatina* se normaliza após maiores doses de glicocorticoides (DC e DEXA) enquanto que menores dosagens tendem a manter sua expressão alta.
- O deflazacorte causa menor impacto sobre a expressão de mRNA de Atrogenes, enquanto apresenta maior expressão de FOXO3a total, o que indica efeito tardio na atrofia muscular em ratos.
- A dexametasona é o glicocorticoide com maior impacto sobre a sinalização da insulina e IGF-1 considerando a expressão de mRNA de *IRS-1*.

8. REFERÊNCIAS

- Agarkova, I. and J. C. Perriard (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 15(9): 477-485.
- Agell, N., O. Bachs, et al. (2002). Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal* 14(8): 649-654.
- Allaire, J., P. Couture, et al. (2016). A randomized, crossover, head-to-head comparison of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation to reduce inflammation markers in men and women: the Comparing EPA to DHA (ComparED) Study. *Am J Clin Nutr* 104(2): 280-287.
- Amirouche, A., A. C. Durieux, et al. (2009). Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* 150(1): 286-294.
- Ausoni, S., L. Gorza, et al. (1990). Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10(1): 153-160.
- Bak, D. H., E. Zhang, et al. (2015). High omega3-polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy. *Sci Rep* 5: 15465.
- Basso, A. D., D. B. Solit, et al. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277(42): 39858-39866.
- Bello, L., H. Gordish-Dressman, et al. (2015). Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 85(12): 1048-1055.
- Bentzinger, C. F., K. Romanino, et al. (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* 8(5): 411-424.
- Biddie, S. C., B. L. Conway-Campbell, et al. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford)* 51(3): 403-412.
- Birkenkamp, K. U. and P. J. Coffey (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 292-297.

- Bish, L. T., K. J. Morine, et al. (2010). Myostatin is upregulated following stress in an Erk-dependent manner and negatively regulates cardiomyocyte growth in culture and in a mouse model. *PLoS One* 5(4): e10230.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911-917.
- Bodine, S. C., E. Latres, et al. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294(5547): 1704-1708.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, et al. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-1019.
- Boonyarom, O. and K. Inui (2006). Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 188(2): 77-89.
- Bourre, J. M. (2005). Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging* 9(1): 31-38.
- Britto, F. A., G. Begue, et al. (2014). REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307(11): E983-993.
- Brook, M. S., D. J. Wilkinson, et al. (2016). Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. *Acta Physiol (Oxf)* 216(1): 15-41.
- Brugarolas, J., K. Lei, et al. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18(23): 2893-2904.
- Buren, J., Y. C. Lai, et al. (2008). Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 474(1): 91-101.
- Busquets, S., M. T. Figueras, et al. (2004). Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 64(18): 6725-6731.
- Caiozzo, V. J., M. J. Baker, et al. (1998). Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* (1985) 85(6): 2237-2248.
- Calder, P. C. (1998). Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res* 31(4): 467-490.
- Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl): 1505S-1519S.

- Campos, Y., X. Qiu, et al. (2010). Ozz-E3 ubiquitin ligase targets sarcomeric embryonic myosin heavy chain during muscle development. *PLoS One* 5(3): e9866.
- Charge, S. B. and M. A. Rudnicki (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1): 209-238.
- Chen, D., S. Chen, et al. (2010). Modulation of satellite cells in rat facial muscle following denervation and delayed reinnervation. *Acta Otolaryngol* 130(12): 1411-1420.
- Chrousos, G. P., E. Charmandari, et al. (2004). Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2): 563-564.
- Ciaraldi, T. P., L. Carter, et al. (2010). GSK-3beta and control of glucose metabolism and insulin action in human skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* 315(1-2): 153-158.
- Cintra, D. E., E. R. Ropelle, et al. (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One* 7(1): e30571.
- Clark, A. R. and M. G. Belvisi (2012). Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther* 134(1): 54-67.
- Clemmons, D. R. (2009). Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab* 20(7): 349-356.
- Combaret, L., D. Dardevet, et al. (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* 569(Pt 2): 489-499.
- Combaret, L., C. Ralliere, et al. (1999). Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Mol Biol Rep* 26(1-2): 95-101.
- Combaret, L., T. Tilignac, et al. (2002). Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochem J* 361(Pt 2): 185-192.
- Cushing, H. (1994). The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. *Obes Res* 2(5): 486-508.
- Das, U. N. (2006). Essential Fatty acids - a review. *Curr Pharm Biotechnol* 7(6): 467-482.
- Dasarathy, S., M. Dodig, et al. (2004). Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287(6): G1124-G1130.
- Davies, E. and S. M. MacKenzie (2003). Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(7): 437-445.

- Daviglus, M. L., J. Stamler, et al. (1997). Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 336(15): 1046-1053.
- DeFronzo, R. A., R. Gunnarsson, et al. (1985). Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76(1): 149-155.
- Dekhuijzen, P. N., G. Gayan-Ramirez, et al. (1995). Rat diaphragm contractility and histopathology are affected differently by low dose treatment with methylprednisolone and deflazacort. *Eur Respir J* 8(5): 824-830.
- Delaunay, A., K. D. Bromberg, et al. (2008). The ER-bound RING finger protein 5 (RNF5/RMA1) causes degenerative myopathy in transgenic mice and is deregulated in inclusion body myositis. *PLoS One* 3(2): e1609.
- Delgado-Lista, J., P. Perez-Martinez, et al. (2012). Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. *Br J Nutr* 107 Suppl 2: S201-213.
- Department of health, D. (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report of the Cardiovascular Review Group Committee on Medical Aspects of Food Policy. *Rep Health Soc Subj (Lond)* 46: 1-186.
- Dokken, B. B., J. A. Sloniger, et al. (2005). Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(6): E1188-1194.
- Dong, Y., J. S. Pan, et al. (2013). Myostatin suppression of Akirin1 mediates glucocorticoid-induced satellite cell dysfunction. *PLoS One* 8(3): e58554.
- Dufner, A., M. Andjelkovic, et al. (1999). Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19(6): 4525-4534.
- Elliott, B., D. Renshaw, et al. (2012). The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)* 205(3): 324-340.
- Ellisen, L. W., K. D. Ramsayer, et al. (2002). REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* 10(5): 995-1005.
- Elmore, J. S., D. S. Mottram, et al. (1999). Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. *J Agric Food Chem* 47(4): 1619-1625.

- Fappi, A., T. S. Godoy, et al. (2014). The effects of omega-3 fatty acid supplementation on dexamethasone-induced muscle atrophy. *Biomed Res Int* 2014: 961438.
- Feldman, B. J., R. S. Streeper, et al. (2006). Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15675-15680.
- Ferraris, J. R., T. Pasqualini, et al. (2000). Effect of deflazacort versus methylprednisone on growth, body composition, lipid profile, and bone mass after renal transplantation. The Deflazacort Study Group. *Pediatr Nephrol* 14(7): 682-688.
- Fielitz, J., M. S. Kim, et al. (2007a). Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 117(9): 2486-2495.
- Fielitz, J., E. van Rooij, et al. (2007b). Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11): 4377-4382.
- Floeter, M. K. (2009). Structure and function of muscle fibers and motor units. Disorders of Voluntary Muscle. Cambridge, Cambridge University Press.
- Florini, J. R., D. Z. Ewton, et al. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17(5): 481-517.
- Freeman, M. P., J. R. Hibbeln, et al. (2006). Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *J Clin Psychiatry* 67(12): 1954-1967.
- Frost, R. A., D. Huber, et al. (2009). Regulation of REDD1 by insulin-like growth factor-I in skeletal muscle and myotubes. *J Cell Biochem* 108(5): 1192-1202.
- Gao, B., Y. H. Han, et al. (2016). Eicosapentaenoic acid attenuates dexamethasone-induced apoptosis by inducing adaptive autophagy via GPR120 in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 7: e2235.
- Garófolo, A. and A. S. Petrilli (2006). Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Revista de Nutrição* 19: 611-621.
- Gebauer, S. K., T. L. Psota, et al. (2006). n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83(6 Suppl): 1526S-1535S.
- Giron, M. D., J. D. Vilchez, et al. (2015). beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) normalizes dexamethasone-induced autophagy-lysosomal pathway in skeletal muscle. *PLoS One* 10(2): e0117520.
- Glass, D. J. (2003). Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med* 9(8): 344-350.

- Glick, D., S. Barth, et al. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221(1): 3-12.
- Goldspink, G. and S. Y. Yang (2004). The splicing of the IGF-I gene to yield different muscle growth factors. *Adv Genet* 52: 23-49.
- Gomes, M. D., S. H. Lecker, et al. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-14445.
- Gonzalez-Perez, O., S. Luquin, et al. (2007). Deflazacort: a glucocorticoid with few metabolic adverse effects but important immunosuppressive activity. *Adv Ther* 24(5): 1052-1060.
- Gordon, B. S., A. R. Kelleher, et al. (2013). Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2147-2157.
- Gordon, J. N., T. M. Trebble, et al. (2005). Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut* 54(4): 540-545.
- Gower, W. R., Jr. (1993). Mechanism of glucocorticoid action. *J Fla Med Assoc* 80(10): 697-700.
- Gredinger, E., A. N. Gerber, et al. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem* 273(17): 10436-10444.
- Grobet, L., D. Pirotin, et al. (2003). Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* 35(4): 227-238.
- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86(3): 564-600.
- Guo, S., S. L. Dunn, et al. (2006). The reciprocal stability of FOXO1 and IRS2 creates a regulatory circuit that controls insulin signaling. *Mol Endocrinol* 20(12): 3389-3399.
- Guyton, A. C. (2002). Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Gwon, D. H., T. W. Hwang, et al. (2017). High Endogenous Accumulation of omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Protect against Ischemia-Reperfusion Renal Injury through AMPK-Mediated Autophagy in Fat-1 Mice. *Int J Mol Sci* 18(10).
- Han, D. S., W. S. Yang, et al. (2017). Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. *Int J Med Sci* 14(5): 434-443.
- Hartmann, J., K. V. Wagner, et al. (2012). The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology* 62(1): 332-339.

- Hasselgren, P. O. (1999). Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2(3): 201-205.
- Hasselgren, P. O., N. Alamdari, et al. (2010). Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(4): 423-428.
- Haugaard, S. B., S. Madsbad, et al. (2006). Dietary intervention increases n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle membrane phospholipids of obese subjects. Implications for insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64(2): 169-178.
- Haugaard, S. B., A. Vaag, et al. (2009). Skeletal muscle structural lipids improve during weight-maintenance after a very low calorie dietary intervention. *Lipids Health Dis* 8: 34.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hirai, S., H. Matsumoto, et al. (2007). Myostatin inhibits differentiation of bovine preadipocyte. *Domest Anim Endocrinol* 32(1): 1-14.
- Hu, S. W., L. L. Xu, et al. (2014). Eicosapentaenoic acid-enriched phosphatidylcholine isolated from *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects via activating phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signal pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117(4): 457-463.
- Hudson, M. B., J. A. Rahnert, et al. (2014). miR-182 attenuates atrophy-related gene expression by targeting FoxO3 in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(4): C314-319.
- Inoue, T., M. Tanaka, et al. (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress the inflammatory responses of lipopolysaccharide-stimulated mouse microglia by activating SIRT1 pathways. *Biochim Biophys Acta* 1862(5): 552-560.
- Iverson, S. J., S. L. Lang, et al. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36(11): 1283-1287.
- Janjoppi, L., M. H. Katayama, et al. (2008). Expression of vitamin D receptor mRNA in the hippocampal formation of rats submitted to a model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine. *Brain Res Bull* 76(5): 480-484.
- Jefferson, L. S., J. R. Fabian, et al. (1999). Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1): 191-200.

- Jeng, J. Y., W. H. Lee, et al. (2009). Functional modulation of mitochondria by eicosapentaenoic acid provides protection against ceramide toxicity to C6 glioma cells. *J Agric Food Chem* 57(24): 11455-11462.
- Jentsch, S., W. Seufert, et al. (1991). Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim Biophys Acta* 1089(2): 127-139.
- Jesinkey, S. R., M. C. Korrapati, et al. (2014). Atomoxetine prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 351(3): 663-673.
- Jiang, L. H., Q. Y. Liang, et al. (2012). Pure docosahexaenoic acid can improve depression behaviors and affect HPA axis in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(13): 1765-1773.
- Jones, A., D. J. Hwang, et al. (2010). Effects of a novel selective androgen receptor modulator on dexamethasone-induced and hypogonadism-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 151(8): 3706-3719.
- Jones, S. W., R. J. Hill, et al. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18(9): 1025-1027.
- Joulia, D., H. Bernardi, et al. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 286(2): 263-275.
- Ju, J. S., A. S. Varadhachary, et al. (2010). Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy* 6(7): 929-935.
- Kadmiel, M. and J. A. Cidlowski (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34(9): 518-530.
- Kaestner, K. H., W. Knochel, et al. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14(2): 142-146.
- Kalinyak, J. E., R. I. Dorin, et al. (1987). Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem* 262(22): 10441-10444.
- Kalista, S., O. Schakman, et al. (2012). The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy. *Endocrinology* 153(1): 241-253.
- Kalupahana, N. S., K. J. Claycombe, et al. (2011). (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr* 2(4): 304-316.

- Kalyani, R. R., M. Corriere, et al. (2014). Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2(10): 819-829.
- Kandalla, P. K., G. Goldspink, et al. (2011). Mechano Growth Factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. *Mech Ageing Dev* 132(4): 154-162.
- Kandarian, S. C. and R. W. Jackman (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33(2): 155-165.
- Kang, K. S., P. Wang, et al. (2010). Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One* 5(4): e10296.
- Karatsoreos, I. N., S. M. Bhagat, et al. (2010). Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology* 151(5): 2117-2127.
- Kasperk, C., U. Schneider, et al. (1995). Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 57(2): 120-126.
- Katiyar, S., E. Liu, et al. (2009). REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep* 10(8): 866-872.
- Kelleher, A. R., S. L. Pereira, et al. (2015). REDD2 expression in rat skeletal muscle correlates with nutrient-induced activation of mTORC1: responses to aging, immobilization, and remobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(2): E122-129.
- Keller, K. and M. Engelhardt (2013). Strength and muscle mass loss with aging process. Age and strength loss. *Muscles Ligaments Tendons J* 3(4): 346-350.
- Kelly, F. J. and D. F. Goldspink (1982). The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem J* 208(1): 147-151.
- Kelly, F. J., J. A. McGrath, et al. (1986). A morphological/biochemical study on the actions of corticosteroids on rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 9(1): 1-10.
- Khal, J. and M. J. Tisdale (2008). Downregulation of muscle protein degradation in sepsis by eicosapentaenoic acid (EPA). *Biochem Biophys Res Commun* 375(2): 238-240.
- Kim, J. W., S. K. Ku, et al. (2015). The administration of Fructus Schisandrae attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Int J Mol Med* 36(1): 29-42.

- Kim, S., K. Jing, et al. (2018). omega3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: In vitro and in vivo. *Oncol Rep* 39(1): 239-246.
- Kim, Y. C. and K. L. Guan (2015). mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 125(1): 25-32.
- Kirkin, V., D. G. McEwan, et al. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34(3): 259-269.
- Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4): 445-544.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
- Komamura, K., H. Shirotani-Ikejima, et al. (2003). Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovasc Drugs Ther* 17(4): 303-310.
- Kopecky, J., M. Rossmeisl, et al. (2009). n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc* 68(4): 361-369.
- Koskela, A., M. Reinisalo, et al. (2016). Nutraceutical with Resveratrol and Omega-3 Fatty Acids Induces Autophagy in ARPE-19 Cells. *Nutrients* 8(5).
- Kovacs, J. J., P. J. Murphy, et al. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18(5): 601-607.
- Kris-Etherton, P. M., W. S. Harris, et al. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106(21): 2747-2757.
- Kudryashova, E., I. Kramerova, et al. (2012). Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J Clin Invest* 122(5): 1764-1776.
- Kunesova, M., R. Braunerova, et al. (2006). The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol Res* 55(1): 63-72.
- Kuo, T., M. J. Lew, et al. (2012). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28): 11160-11165.

- Lanfranco, F., R. Giordano, et al. (2004). Free fatty acids exert an inhibitory effect on adrenocorticotropin and cortisol secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1385-1390.
- Le Foll, C., C. Corporeau, et al. (2007). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(4): E1223-1230.
- Le, H. D., J. A. Meisel, et al. (2009). The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81(2-3): 165-170.
- Lee, J. Y., N. S. Hopkinson, et al. (2011). Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 415(4): 632-636.
- Lee, M. S., Y. Shin, et al. (2016). Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Mitochondrial DNA Replication and PGC-1alpha Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *Prev Nutr Food Sci* 21(4): 317-322.
- Leger, B., R. Cartoni, et al. (2006). Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 576(Pt 3): 923-933.
- Leonard, A. E., S. L. Pereira, et al. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43(1): 36-54.
- Lepper, C., T. A. Partridge, et al. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138(17): 3639-3646.
- Li, B., Y. Wang, et al. (2013). Altered gene expression involved in insulin signaling pathway in type II diabetic osteoporosis rats model. *Endocrine* 43(1): 136-146.
- Li, H. H., V. Kedar, et al. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest* 114(8): 1058-1071.
- Lin, J., H. Wu, et al. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418(6899): 797-801.
- Lin, L., T. M. Stringfield, et al. (2005). Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein. *Biochem J* 392(Pt 1): 93-102.
- Lin, P. Y. and K. P. Su (2007). A meta-analytic review of double-blind, placebo-controlled trials of antidepressant efficacy of omega-3 fatty acids. *J Clin Psychiatry* 68(7): 1056-1061.

- Liu, Y., F. Chen, et al. (2013). Fish oil increases muscle protein mass and modulates Akt/FOXO, TLR4, and NOD signaling in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. *J Nutr* 143(8): 1331-1339.
- Livneh, I., V. Cohen-Kaplan, et al. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research* 26(8): 869-885.
- Lokireddy, S., C. McFarlane, et al. (2011). Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol Endocrinol* 25(11): 1936-1949.
- Long, Y. C., Z. Cheng, et al. (2011). Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Mol Cell Biol* 31(3): 430-441.
- Ma, K., C. Mallidis, et al. (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E363-371.
- Macedo, A. G., A. L. Krug, et al. (2016). Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. *Steroids* 107: 30-36.
- Maes, K., A. Agten, et al. (2010). Corticosteroid effects on ventilator-induced diaphragm dysfunction in anesthetized rats depend on the dose administered. *Respir Res* 11: 178.
- Maes, K., D. Testelmans, et al. (2008). Effects of acute administration of corticosteroids during mechanical ventilation on rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 178(12): 1219-1226.
- Magee, P., S. Pearson, et al. (2008). The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. *Lipids Health Dis* 7: 24.
- Mammucari, C., G. Milan, et al. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6(6): 458-471.
- Mammucari, C., S. Schiaffino, et al. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 4(4): 524-526.
- Marinovic, A. C., B. Zheng, et al. (2002). Ubiquitin (UbC) expression in muscle cells is increased by glucocorticoids through a mechanism involving Sp1 and MEK1. *J Biol Chem* 277(19): 16673-16681.

- Marzuca-Nassr, G. N., K. F. Vitzel, et al. (2016). Effects of high EPA and high DHA fish oils on changes in signaling associated with protein metabolism induced by hindlimb suspension in rats. *Physiol Rep* 4(18).
- Matsakas, A. and K. Patel (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 24(5): 611-629.
- McElhinny, A. S., K. Kakinuma, et al. (2002). Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* 157(1): 125-136.
- McFarlane, C., E. Plummer, et al. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209(2): 501-514.
- McPherron, A. C. and S. J. Lee (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12457-12461.
- Medina, R., S. S. Wing, et al. (1995). Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J* 307 (Pt 3): 631-637.
- Meikle, A. W. and F. H. Tyler (1977). Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. *Am J Med* 63(2): 200-207.
- Menezes, L. G., C. Sobreira, et al. (2007). Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. *J Appl Physiol* (1985) 102(2): 698-703.
- Menke, A., T. Klengel, et al. (2013). Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. *Genes Brain Behav* 12(3): 289-296.
- Messamore, E., D. M. Almeida, et al. (2017). Polyunsaturated fatty acids and recurrent mood disorders: Phenomenology, mechanisms, and clinical application. *Prog Lipid Res* 66: 1-13.
- Miller, T. C. (2015). Efeito da suplementação de Ácidos Graxos Ômega-3 no músculo esquelético e no perfil lipídico em ratos submetidos à natação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

- Mitchell, W. K., J. Williams, et al. (2012). Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Front Physiol* 3: 260.
- Miyazaki, M. and K. A. Esser (2009). REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(3): C583-592.
- Moore, L. M., A. G. Fisher, et al. (2008). Real-time polymerase chain reaction to follow the response of muscle to training. *Artif Organs* 32(8): 630-633.
- Mordier, S., C. Deval, et al. (2000). Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 275(38): 29900-29906.
- Murakami, T., K. Hasegawa, et al. (2011). Rapid induction of REDD1 expression by endurance exercise in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 405(4): 615-619.
- Nader, G. A. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 1985-1996.
- Nadolnik, L. (2012). Role of Glucocorticoids in Regulation of Iodine Metabolism in Thyroid Gland: Effects of Hyper-And Hypocorticism. Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend. X. Qian, InTech.
- Najbjerg, H., J. F. Young, et al. (2011). NMR-based metabolomics reveals that conjugated double bond content and lipid storage efficiency in HepG2 cells are affected by fatty acid cis/trans configuration and chain length. *J Agric Food Chem* 59(16): 8994-9000.
- Nava, S., G. Gayan-Ramirez, et al. (1996). Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 153(6 Pt 1): 1888-1896.
- Nayak, S. and B. Acharjya (2008). Deflazacort versus other glucocorticoids: a comparison. *Indian J Dermatol* 53(4): 167-170.
- Nedergaard, A., M. A. Karsdal, et al. (2013). Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 4(1): 1-17.
- Nicastro, H., N. E. Zanchi, et al. (2012). Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition* 28(4): 465-471.

- Nicolaides, N. C., E. Charmandari, et al. (2014). Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocr Disord* 14: 71.
- Nicolaides, N. C., Z. Galata, et al. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75(1): 1-12.
- Nishida, H., A. Ikegami, et al. (2015). Dexamethasone and BCAA Failed to Modulate Muscle Mass and mTOR Signaling in GH-Deficient Rats. *PLoS One* 10(6): e0128805.
- Ogilvie, R. W. and D. L. Feedback (1990). A metachromatic dye-ATPase method for the simultaneous identification of skeletal muscle fiber types I, IIA, IIB and IIC. *Stain Technol* 65(5): 231-241.
- Oh, D. Y., S. Talukdar, et al. (2010). GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* 142(5): 687-698.
- Ottenheijm, C. A., L. M. Heunks, et al. (2008). Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res* 9: 12.
- Pallafacchina, G., B. Blaauw, et al. (2013). Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23 Suppl 1: S12-18.
- Palmer, R. M. and K. W. Wahle (1987). Protein synthesis and degradation in isolated muscle. Effect of omega 3 and omega 6 fatty acids. *Biochem J* 242(2): 615-618.
- Passaquin, A. C., P. Lhote, et al. (1998). Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 124(8): 1751-1759.
- Pereira, R. M. and J. Freire de Carvalho (2011). Glucocorticoid-induced myopathy. *Joint Bone Spine* 78(1): 41-44.
- Perini, J. Â. D. L., F. B. Stevanato, et al. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de Nutrição* 23: 1075-1086.
- Perrini, S., L. Laviola, et al. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 205(3): 201-210.
- Pey, P., S. Daminet, et al. (2012). Effect of glucocorticoid administration on adrenal gland size and sonographic appearance in beagle dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 53(2): 204-209.

- Pinheiro, C. H., W. M. Sousa Filho, et al. (2009). Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. *Arq Bras Cardiol* 93(4): 400-408, 392-400.
- Pires-Oliveira, M., A. L. Maragno, et al. (2010). Testosterone represses ubiquitin ligases atrogen-1 and Murf-1 expression in an androgen-sensitive rat skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* (1985) 108(2): 266-273.
- Powell, S. R. (2006). The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H1-H19.
- Prezant, D. J., M. L. Karwa, et al. (1997). Gender-specific effects of dexamethasone treatment on rat diaphragm structure and function. *J Appl Physiol* (1985) 82(1): 125-133.
- Qin, J., R. Du, et al. (2013). Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy was associated with upregulation of myostatin promoter activity. *Res Vet Sci* 94(1): 84-89.
- Qin, W., J. Pan, et al. (2010). Protection against dexamethasone-induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC-1alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 403(3-4): 473-478.
- Reardon, K. A., J. Davis, et al. (2001). Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24(7): 893-899.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, et al. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 23(20): 7230-7242.
- Reed, U. C. (2002). [Neuromuscular disorders]. *J Pediatr (Rio J)* 78 Suppl 1: S89-S103.
- Reid, K. F. and R. A. Fielding (2012). Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exerc Sport Sci Rev* 40(1): 4-12.
- Reisner, K., M. Lehtonen, et al. (2011). Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant fat-3. *J Biochem Mol Toxicol* 25(5): 269-279.
- Rhen, T. and J. A. Cidlowski (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353(16): 1711-1723.
- Rizzi, R., C. Bearzi, et al. (2012). Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. *Muscles Ligaments Tendons J* 2(3): 230-234.

- Rommel, C., B. A. Clarke, et al. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286(5445): 1738-1741.
- Ruzickova, J., M. Rossmeisl, et al. (2004). Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* 39(12): 1177-1185.
- Ryall, J. G., D. R. Plant, et al. (2004). Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *J Physiol* 555(Pt 1): 175-188.
- Sandri, M., J. Lin, et al. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44): 16260-16265.
- Sandri, M., C. Sandri, et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117(3): 399-412.
- Schacke, H., W. D. Docke, et al. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96(1): 23-43.
- Schakman, O., H. Gilson, et al. (2009). Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res* 72 Suppl 1: 36-41.
- Schakman, O., H. Gilson, et al. (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197(1): 1-10.
- Schakman, O., S. Kalista, et al. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2163-2172.
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, et al. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280(17): 4294-4314.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91(4): 1447-1531.
- Sener, A., Y. Zhang, et al. (2009). The metabolic syndrome of omega3-depleted rats. II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. *Int J Mol Med* 24(1): 125-129.
- Shen, L., Y. Yang, et al. (2017). Dietary PUFAs attenuate NLRP3 inflammasome activation via enhancing macrophage autophagy. *J Lipid Res* 58(9): 1808-1821.
- Shi, H., J. M. Scheffler, et al. (2008). Modulation of skeletal muscle fiber type by mitogen-activated protein kinase signaling. *FASEB J* 22(8): 2990-3000.
- Shi, H., C. Zeng, et al. (2007). Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5): C1681-1689.

- Shirai, N., H. Suzuki, et al. (2005). Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Anal Biochem* 343(1): 48-53.
- Short, K. R., J. L. Vittone, et al. (2004). Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(1): E92-101.
- Shulman, G. I., D. L. Rothman, et al. (1990). Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322(4): 223-228.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21(6): 495-505.
- Simopoulos, A. P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev Nutr Diet* 99: 1-16.
- Singer, P., H. Shapiro, et al. (2008). Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med* 34(9): 1580-1592.
- Smith, H. J., N. A. Greenberg, et al. (2004). Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice. *Br J Cancer* 91(2): 408-412.
- Sohal, P. S., V. E. Baracos, et al. (1992). Dietary omega 3 fatty acid alters prostaglandin synthesis, glucose transport and protein turnover in skeletal muscle of healthy and diabetic rats. *Biochem J* 286 (Pt 2): 405-411.
- Song, C., A. G. Phillips, et al. (2004). Ethyl-eicosapentaenoic acid ingestion prevents corticosterone-mediated memory impairment induced by central administration of interleukin-1beta in rats. *Mol Psychiatry* 9(6): 630-638.
- Song, I. H. and F. Buttgerit (2006). Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2): 142-146.
- Song, J., Z. Li, et al. (2015). Genome-wide identification and characterization of Fox genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Funct Integr Genomics* 15(5): 511-522.
- Soukup, T., V. Smerdu, et al. (2009). Fiber type composition of unoperated rat soleus and extensor digitorum longus muscles after unilateral isotransplantation of a foreign muscle in long-term experiments. *Physiol Res* 58(2): 253-262.
- Stewart, C. E. and J. Rittweger (2006). Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(1): 73-86.

- Stitt, T. N., D. Drujan, et al. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14(3): 395-403.
- Sun, D., A. Krishnan, et al. (2003). Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 18(7): 1206-1216.
- Surette, M. E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids. *CMAJ* 178(2): 177-180.
- Takeuchi, T., M. Iwanaga, et al. (2003). Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats. *Brain Res* 964(1): 136-143.
- Taouis, M., C. Dagou, et al. (2002). N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282(3): E664-E671.
- Tasker, J. G., S. Di, et al. (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147(12): 5549-5556.
- Taves, M. D., C. E. Gomez-Sanchez, et al. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(1): E11-24.
- Termin, A., R. S. Staron, et al. (1989). Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles. A single-fiber study. *Eur J Biochem* 186(3): 749-754.
- Tisdale, M. J. (2006). Clinical anticachexia treatments. *Nutr Clin Pract* 21(2): 168-174.
- Tisdale, M. J. (2007). Eicosapentaenoic acid containing nutritional supplements for the treatment of cancer cachexia. *Clin Nutr* 26(1): 161-162; author reply 163.
- Troncoso, R., F. Paredes, et al. (2014). Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle* 13(14): 2281-2295.
- Tsuchida, W., M. Iwata, et al. (2017). Heat Stress Modulates Both Anabolic and Catabolic Signaling Pathways Preventing Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy In Vitro. *J Cell Physiol* 232(3): 650-664.
- Umeki, D., Y. Ohnuki, et al. (2015). Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One* 10(6): e0128263.
- Vallette, G., C. Sumida, et al. (1995). Unsaturated fatty acids synergistically enhance glucocorticoid-induced gene expression. *Cell Signal* 7(4): 319-323.

- Van Der Heide, L. P., M. F. Hoekman, et al. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380(Pt 2): 297-309.
- van der Horst, A. and B. M. Burgering (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 440-450.
- van Rossum, E. F. and S. W. Lamberts (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59: 333-357.
- Vandevyver, C., J. Vanhoof, et al. (1999). Lack of association between estrogen receptor genotypes and bone mineral density, fracture history, or muscle strength in elderly women. *J Bone Miner Res* 14(9): 1576-1582.
- Vandevyver, S., L. Dejager, et al. (2014). Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev* 35(4): 671-693.
- Vannice, G. and H. Rasmussen (2014). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Dietary Fatty Acids for Healthy Adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114(1): 136-153.
- Vaughan, R. A., R. Garcia-Smith, et al. (2012). Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells. *Lipids Health Dis* 11: 142.
- Verhees, K. J., A. M. Schols, et al. (2011). Glycogen synthase kinase-3beta is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(5): C995-C1007.
- Vilchez, D., I. Saez, et al. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 5: 5659.
- Voisin, L., D. Breuille, et al. (1996). Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 97(7): 1610-1617.
- Wang, C., Y. Liu, et al. (2014). G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int J Mol Sci* 15(9): 15412-15425.
- Wang, H., N. Kubica, et al. (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem* 281(51): 39128-39134.

- Wang, R., H. Jiao, et al. (2016). Glucocorticoids Enhance Muscle Proteolysis through a Myostatin-Dependent Pathway at the Early Stage. *PLoS One* 11(5): e0156225.
- Wang, Z., J. Frederick, et al. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277(29): 26573-26580.
- Whitehouse, A. S., H. J. Smith, et al. (2001). Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res* 61(9): 3604-3609.
- Wiktorowska-Owczarek, A., M. Berezinska, et al. (2015). PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* 24(6): 931-941.
- Williamson, D., P. Gallagher, et al. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol* 547(Pt 3): 977-987.
- Winbanks, C. E., K. L. Weeks, et al. (2012). Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J Cell Biol* 197(7): 997-1008.
- Wing, S. S. and A. L. Goldberg (1993). Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1): E668-676.
- Wu, Y., W. Zhao, et al. (2010). REDD1 is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss. *Endocrinology* 151(3): 1050-1059.
- Wulf, A., A. Harneit, et al. (2008). T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol* 287(1-2): 90-95.
- Wyke, S. M., S. T. Russell, et al. (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* 91(9): 1742-1750.
- Xie, Z. and D. J. Klionsky (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9(10): 1102-1109.
- Yamamoto, D., T. Maki, et al. (2010). Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. *Muscle Nerve* 41(6): 819-827.
- Yan, Z., M. Okutsu, et al. (2011). Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 110(1): 264-274.

- Yang, Y. C., C. K. Lii, et al. (2013). Docosahexaenoic acid inhibition of inflammation is partially via cross-talk between Nrf2/heme oxygenase 1 and IKK/NF-kappaB pathways. *J Nutr Biochem* 24(1): 204-212.
- Yao, Q., T. Fu, et al. (2015). Role of autophagy in the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid-induced death of lung cancer A549 cells. *Oncol Lett* 9(6): 2736-2742.
- Yimlamai, T., S. L. Dodd, et al. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* (1985) 99(1): 71-80.
- Yin, H. N., J. K. Chai, et al. (2009). Regulation of signaling pathways downstream of IGF-I/insulin by androgen in skeletal muscle of glucocorticoid-treated rats. *J Trauma* 66(4): 1083-1090.
- Yoshimura, M., A. Nakamura, et al. (2007). Deflazacort induced severe skeletal muscle wasting and inguinal herniation in normal Beagle dogs. *Neuromuscular Disorders* 17(9-10): 775-775.
- Yoshizawa, F., T. Kido, et al. (1999). Stimulative effect of dietary protein on the phosphorylation of p70 S6 kinase in the skeletal muscle and liver of food-deprived rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(10): 1803-1805.
- You, J. S., M. N. Park, et al. (2010). Dietary fish oil alleviates soleus atrophy during immobilization in association with Akt signaling to p70s6k and E3 ubiquitin ligases in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 35(3): 310-318.
- Youdim, K. A., A. Martin, et al. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 18(4-5): 383-399.
- Yu, J. K., F. Mazet, et al. (2008). The Fox genes of Branchiostoma floridae. *Dev Genes Evol* 218(11-12): 629-638.
- Zhang, X. W., Y. Li, et al. (2006). Glucocorticoid receptor subunit gene expression in thyroid gland and adenomas. *Acta Oncol* 45(8): 1073-1078.
- Zhang, Y., B. Gan, et al. (2011). FoxO family members in cancer. *Cancer Biol Ther* 12(4): 253-259.
- Zhao, W., J. Pan, et al. (2008). Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110(1-2): 125-129.

- Zheng, B., S. Ohkawa, et al. (2010). FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *FASEB J* 24(8): 2660-2669.
- Zhong, H., R. R. Roy, et al. (2007). Differential modulation of myosin heavy chain phenotype in an inactive extensor and flexor muscle of adult rats. *J Anat* 210(1): 19-31.
- Zhu, X., S. Topouzis, et al. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26(6): 262-272.
- Zimmers, T. A., M. V. Davies, et al. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296(5572): 1486-1488.

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Laudo de análise de conteúdo da cápsula fornecida aos animais. **LAUDO DE ANÁLISES****GLOBAL NUTRITION SUPRA OMEGA 50EPA/10DHA 1000MG 90**

Cliente - ALAN FAPPI
 Quantidade - 1,000 UN
 Data de Fabricação - 27/09/2013
 Data de Validade - 27/09/2015

Nota Fiscal - 006175 21/01/2015

Lote do Fornecedor - 001567
 Procedência - BRASIL

Nome Químico/ou Botânico - NA
 Peso Molecular - NA
 DCB - NA

Fórmula Molecular - NA
 CAS - NA

ARMAZENAR EM LOCAL SECO, AREJADO E PROTEGIDO DA LUZ DIRETA
 EM TEMPERATURA DE 15 A 30°C E UMIDADE RELATIVA ENTRE 40 A 75%.

Análise / Ensaios	Especificações	Resultados das Análises
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		
DESCRIÇÃO DA CÁPSULA	CÁPSULA MOLE DE GELATINA, MOLDE	CONFORME
	OBLONG Nº16, INCOLOR, BRILHOSA	
	SELAGEM E DUREZA	
DESCRIÇÃO DO CONTEÚDO	LÍQUIDO OLEOSO, AMARELO, ODOR	CONFORME
	CARACTERÍSTICO, LÍMPIDO	
PESO MÉDIO BRUTO	INFORMATIVO	1381,30 MG/CAPS
PESO MÉDIO DO CONTEÚDO	925,00 A 1075,00 MG/CAPS	978,60 MG/CAPS
DESINTEGRAÇÃO	MÁXIMO 30 MINUTOS	8,0 MINUTOS
ÁCIDOS GRAXOS		
ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO C20:5 EPA	> OU = 50 %	50,60 %
ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO C20:6 DHA	> OU = 10 %	13,30 %
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS		
COLIFORMES A 45°C	MÁXIMO 5,0	< 0,3
MÉRCÚRIO	< 0,01 MG/KG	NÃO DETECTADO
*INFORMAÇÕES DE ACORDO COM LAUDO DO FABRICANTE		

Especificações e resultados

ESPECIFICAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DE ACORDO COM DESENVOLVIMENTO LOCAL E LAUDO DO FORNECEDOR.

ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE ACORDO COM RDC Nº 12 DE 02/01/01.

MGA FÍSICO - QUÍMICAS DE ACORDO COM A FB 5ª EDIÇÃO

MGA MICROBIOLÓGICAS DE ACORDO COM MAPA - INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº62

CONCLUSÃO(X) APROVADO

Informação Técnica - Dentro dos itens pesquisados, o lote cumpre com as especificações.

 David Leandro S. da Silva
 Responsável Técnico
 CRF-GO: 30843

 Valéria Chagas Faria
 Coordenadora Controle da Qualidade

Documento assinado eletronicamente.

SOFTECH BRASIL S/A

VIELA VI L1 QD. MODULO 01-DAIA-ANAPOLIS - GO - 75132013 - Fone (62) 3937-8600 - Fax