

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**  
**(Convênio UFSCar – UNESP Araraquara)**

**EFEITO DO DECANOATO DE NANDROLONA ASSOCIADO AO EXERCÍCIO**  
**DE CARGA NA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE**  
**ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

**Milena de Moura Paschoal**

**São Carlos – SP**

**2008**

**EFEITO DO DECANOATO DE NANDROLONA ASSOCIADO AO EXERCÍCIO  
DE CARGA NA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE  
ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

**Milena de Moura Paschoal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

São Carlos – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P279ed

Paschoal, Milena de Moura.

Efeito do decanoato de nandrolona associado ao exercício de carga na expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) no músculo sóleo de ratos / Milena de Moura Paschoal. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 65 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Expressão gênica e exercício. 2. Esteroides anabólicos. 3. Músculo sóleo. 4. VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular). 5. Exercícios – força. 6. Neovascularização. I. Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Milena de Moura Paschoal

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... 

Profa. Dra. Rozangela Verlengia..... 

Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini..... 

---

**Orientadora**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo**

***Dedicatória***

*Aos meus pais que sempre me  
orientam e me apóiam nas minhas decisões.  
Que eu consiga retribuir tudo aquilo que  
eles têm feito por mim...*

## Agradecimentos

Minha caminhada na Biologia começou no laboratório de taxonomia de peixes, teve uma passagem rápida pela limnologia, quase entrou na botânica, passou por pesquisas e estágios em educação escolar e educação ambiental e culminou na fisiologia, ou para ser mais exata na biologia molecular. Dessa forma com certeza esses “dois” anos de mestrado foram regados de muito aprendizado, entre as técnicas e o conteúdo teórico. Aprendizado esse que exigiu muito trabalho, estudo, momentos de tristeza, de alegria, mas que fez com que eu amadurecesse. Ao longo desses dois anos conheci muitas pessoas e que de certa forma deixarão muitas lembranças. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para esse enriquecimento e amadurecimento:

Aos meus pais,  
Que são a minha estrutura e que me deram todo apoio nessa minha caminhada...

À minha irmã,  
Sempre amiga e parceira...

À minha família,  
Especialmente minha tia Clarice e minha prima Monica, que me acolheram em São Carlos e acompanharam de perto minha trajetória.

À minha orientadora,  
Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, por ter me dado essa oportunidade, ter me auxiliado sempre que precisei. Uma pessoa muito inteligente, exigente, divertida e afetuosa.

Ao CNPq,  
Pela bolsa concedida para a realização desse trabalho.

Ao professor,  
Sérgio Eduardo de Andrade Perez, pela parceria com o Laboratório de Fisiologia do Exercício, que contribuiu para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao professor,  
Flávio Henrique da Silva, do Departamento de Genética, que nos cedeu espaço no seu freezer para guardar nossas amostras.

Ao Laboratório de Neurociência e Plasticidade Muscular,  
Especialmente aos alunos, Sabrina, Thiago e João, por ajudarem na realização das técnicas, por cederem os primers para que os experimentos pudessem ser realizados.

Ao “Cacau”,  
Técnico do Laboratório de Fisiologia do Exercício, pelo auxílio e competência na retirada dos músculos, além do carinho com que trata as pessoas.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular,

Sempre dispostos a ajudar nas tarefas, pela troca de experiências, os momentos divertidos.

Às amigas,

Rita, Carmen Lúcia e Thaíssa, por compartilharem as alegrias, tristezas, pelas boas risadas, que fez com que esses anos se tornassem muito agradáveis, e com as quais eu pude contar sempre. Pessoas muito especiais, que tenho um imenso carinho e que levarei no meu coração...

A todos que de alguma forma acompanharam essa caminhada, estando perto ou longe...



*“Eu não me envergonho de corrigir meus  
erros e mudar minhas opiniões, porque  
não me envergonho de raciocinar e  
aprender”.*

*(Alexandre Herculano)*

*“O futuro tem muitos nomes: para os fracos,  
ele é inatingível; para os temerosos, ele é  
desconhecido; para os corajosos, ele é a chance...”*

*(Victor Hugo)*

## RESUMO

Muitos estudos vêm mostrando os efeitos nocivos para o organismo do abuso de esteróides anabólicos androgênicos (EAA) por atletas e freqüentadores de academia. Entretanto há poucas pesquisas relatando os efeitos prejudiciais dessas substâncias no músculo esquelético. O objetivo desse trabalho foi analisar a expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) no músculo sóleo de ratos submetidos ao tratamento com EAA e ao exercício de carga. Os animais foram divididos em quatro grupos: S (sedentário controle), T (treinado controle), EAA (sedentário com administração de decanoato de nandrolona) e EAAT (treinado com administração de decanoato de nandrolona). O treinamento foi constituído por saltos em meio líquido à 32°C: 4 séries de 10 saltos cada, com intervalo de 30 segundos entre as séries, em 5 dias da semana, durante 7 semanas, com carga variando de 50 – 80% da massa corporal do animal. O decanoato de nandrolona (Decadurabolin<sup>®</sup> - 5mg/kg) foi injetado via subcutânea no dorso dos animais, duas vezes por semana. A análise da expressão de mRNA de VEGF, por PCR em tempo real mostrou que no grupo que treinou e que não recebeu a injeção de EAA houve aumento significativo na expressão desse fator em relação aos grupos que não treinaram (S e EAA). Por outro lado, quando o treino foi associado com a administração de EAA houve inibição da expressão de VEGF em relação ao grupo treinado controle. VEGF é um fator chave na indução da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e essa é uma das primeiras adaptações do músculo ao exercício. Em conclusão a diminuição da expressão de VEGF com o uso de EAA poderia provocar uma redução na formação desses novos vasos, promovendo possivelmente uma redução na performance.

Palavras-chave: esteróides anabólicos-androgênicos, músculo esquelético, fator de crescimento de endotélio vascular, exercício de carga, angiogênese.

## ABSTRACT

Androgenic-anabolic steroids have been used both for performance improvement and aesthetic reasons. It is well known that high doses of AAS can raise serious adverse effects such as skeletal muscle injuries including increase in the rate of muscle strains/ruptures. The aim of this study was to investigate VEGF mRNA expression in the rat soleus muscle after jumping training associated with androgenic-anabolic steroids (AAS) administration. Wistar rats were grouped into: sedentary (S); trained without AAS (T); nandrolone decanoate (ND)-treated sedentary (AAS); and trained with AAS (AAST). The trained groups have carried out jumps in water at 32°C.: 4 series of 10 jumps each, with a 30-second interval among series, for 7 weeks, with 50-80% overload of the animal corporal mass. The AAS (Decadurabolin<sup>®</sup> - 5mg/kg) was injected via subcutaneous in animal back twice a week. Real-time PCR analyses have shown that training significantly increased VEGF mRNA expression in comparison with the S, AAS groups. When training exercise was associated with nandrolone decanoate, the VEGF mRNA expression was inhibited compared with T group. The inhibited expression of VEGF by AAS administration could cause diminished angiogenesis in skeletal muscle. These results suggest that the AAS may be strongly prejudicial to muscle remodeling and performance.

Keywords: androgenic-anabolic steroids, skeletal muscle, vascular endothelial growth factor, loading exercise, angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biotransformação da testosterona .....	5
Figura 2	Grupos de EAA .....	6
Figura 3	Estrutura hierárquica do músculo esquelético .....	15
Figura 4	Estrutura da fibra muscular .....	17
Figura 5	Especificidade da ligação dos membros da família de VEGF aos receptores de VEGF, VEGFR-1, 2 e 3 .....	23
Figura 6	Sinalização celular de VEGF .....	25
Figura 7	Isoformas de VEGF-A .....	26
Figura 8	Colete confeccionado para o acoplamento das cargas na realização do protocolo experimental .....	36
Figura 9	Um dos animais durante o intervalo entre as séries .....	37
Figura 10	RNA total extraído do músculo sóleo esquerdo de dois animais de cada grupo, resolvido em gel de agarose 1% .....	41
Figura 11	Perfil eletroforético de cDNA de VEGF produzido a partir de RNA total extraído do músculo sóleo. ....	42
Figura 12	Perfil eletroforético de cDNA de GAPDH produzido a partir de RNA total extraído do músculo sóleo .....	43
Figura 13	Representação gráfica da expressão gênica de VEGF em unidades arbitrárias (UA) .....	45
Figura 14	Representação gráfica da expressão gênica de VEGF em unidades arbitrárias (UA) .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Varição do peso corporal final entre os diferentes grupos .....	40
Tabela 2	Varição do peso muscular normalizada pelo peso corporal final entre os diferentes grupos .....	40
Tabela 3	Cálculo da expressão do mRNA de VEGF obtido pela PCR em tempo real .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitros
Ang1	angiopoietina 1
Ang2	angiopoietina 2
ATP	adenosina trifosfato
BAD	promotor de morte associado a Bcl-2
Bcl-2	proteína de célula de linfoma B – 2
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico
cGMP	guanosina monofosfato ciclase
Cm	centímetro
COI	Comitê Olímpico Internacional
Ct	linha de base do ciclo
DEPC	dietilpirocarbonato
DHEA	desidroepiandrosterona
DHT	diidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucléico
EAA	esteróides androgênicos-anabólicos
EDL	músculo extensor longo dos dedos
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
FAK	quinase de adesão focal
FDA	Administração de drogas e alimentos
FHS	hormônio folículo estimulante
Flt-1	Fms-tipo tirosino-quinase 1
G	grama
GAPDH	gliceraldeído fostato desidrogenase
GnRH	hormônio liberador de gonadotropinas
GTP	guanosina trifosfato
HDL	lipoproteína de alta densidade
HSPGs	proteoglicanas heparana-sulfato

HTGL	triglicerídeo lipase hepática
IGF-1	fator de crescimento tipo-insulina-1
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
KDR	receptor que contém domínio de inserção quinase
Kg	quilograma
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	hormônio luteinizante
LO	lentas oxidativas
MAPK	proteína quinase ativadora de mitose
mATPase	adenosina trifosfatase miofibrilar
MEK	proteína quinase ativadora de mitose
Mg	miligrama
MHC	cadeia pesada de miosina
mL	mililitro
mM	milimolar
MMP	metaloproteases de matriz
MOPS	Ácido 3-N Morfolino Propanosulfônico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR- $\beta$	receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas- $\beta$
PECAM-1	molécula de adesão de célula endotelial à plaqueta 1
PI3K	fosfatidilinositol-3 quinase
PKC	proteína quinase-C
PKB	proteína quinase-B
PLC- $\gamma$	fosfolipase-C $\gamma$
PIGF	fator de crescimento de placenta
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
SNC	sistema nervoso central
TGF- $\beta$ 1	fator de crescimento de transformação- $\beta$ 1
TnC	troponina C
TnI	troponina I
TnT	troponina T
tPA	ativador de plasminogênio de tecido

UA	unidade arbitrária
uPA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VE-caderina	caderina endotelial vascular
VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular
VEGFR1	receptores do fator de crescimento de endotélio vascular 1
VEGFR2	receptores do fator de crescimento de endotélio vascular 2
VEGFR3	receptores do fator de crescimento de endotélio vascular 3



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 HISTÓRICO DOS ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS	2
2.2 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DOS EAA	3
2.3 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DOS EAAS	6
2.4 FORMA DE USO POR ATLETAS	8
2.5 EFEITOS DESEJÁVEIS DOS EAA	9
2.6 PRINCIPAIS EFEITOS ADVERSOS DOS EAA	10
2.6.1 <i>Efeitos no sistema reprodutivo</i>	10
2.6.2 <i>Efeitos hepáticos</i>	11
2.6.3 <i>Efeitos cardiovasculares</i>	11
2.6.4 <i>Efeitos psicológicos e comportamentais</i>	13
2.6.5 <i>Efeitos músculoesqueléticos</i>	13
2.7 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS	14
2.8 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES	18
2.9 ADAPTAÇÕES DO MÚSCULO AO EXERCÍCIO	19
2.10 O MODELO DE SALTO	20
2.11 FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)	22
2.12 VEGF-A	23
2.13 RECEPTORES E CO-RECEPTORES DE VEGF	26
2.14 VEGF E EXERCÍCIO	27
2.15 ANGIOGÊNESE	28
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>32</b>
<b>4 HIPÓTESE</b>	<b>33</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
5.1 ANIMAIS	34
5.2 DESENHO EXPERIMENTAL	34
5.2.1 <i>Grupo Sedentário</i>	34
5.2.2 <i>Grupo treinado</i>	34
5.3 TRATAMENTO COM EAA	35
5.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO	35
5.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E RETIRADA DO MÚSCULO SÓLEO.	37
5.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.	37
5.7 SÍNTESE DE CDNA E PCR SEMIQUANTITAVO	38
5.8 PCR QUANTITATIVO	38
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>40</b>
6.1 PESO DOS ANIMAIS	40
6.2 PESO DOS MÚSCULOS	40
6.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	40
6.4 SÍNTESE DE CDNA E PCR SEMIQUANTITATIVO	41
6.5 PCR EM TEMPO REAL	43
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>8 CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>

**9 REFERÊNCIAS**

**52**

**ANEXO**

**62**

## 1 INTRODUÇÃO

A busca pelo melhor desempenho em competições faz com que os atletas procurem recursos que provêem uma melhora na performance sem que se preocupem com os riscos que os mesmos podem trazer a saúde. O uso desses recursos no esporte é denominado doping e se refere à aplicação, ou ingestão, de substâncias não fisiológicas, ou também substâncias fisiológicas, em quantidades anormais, visando à intensificação ilícita do desempenho em competições (SANTOS, 2007).

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) estão entre os recursos utilizados pelos atletas para aumento da massa muscular e aumento das chances de vitória nas competições. Apesar das inúmeras pesquisas realizadas já ressaltarem os efeitos nocivos dos EAA, ele continua sendo amplamente utilizado, não apenas por atletas de elite, mas vem também crescendo o uso dessas substâncias por atletas amadores e adolescentes que freqüentam academias buscando a melhora na aparência física. O abuso no uso de esteróides anabólicos pode levar a conseqüências prejudiciais ao organismo além de efeitos psicológicos e comportamentais.

Têm sido bem descritos na literatura os efeitos prejudiciais dos EAA ao músculo e aos tendões, onde já foram relatados muitos casos de rompimento. Porém poucos trabalhos têm mostrado os efeitos intramusculares dos EAA.

Nesse trabalho foi analisado o efeito dos EAA na expressão de VEGF no músculo esquelético. O VEGF, fator de crescimento de endotélio vascular, é um dos principais indutores da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese é uma das primeiras adaptações que ocorrem no músculo esquelético em resposta ao treinamento, devido à necessidade de um grande aporte sanguíneo durante o exercício (WATERS et al, 2004). Vários trabalhos já relataram o aumento da expressão de VEGF no músculo esquelético com o treinamento e que esse aumento foi acompanhado com o aumento na capilarização. Entretanto o efeito dos esteróides anabólicos na expressão de VEGF ainda não havia sido relatado.

Dessa forma, esse trabalho teve por finalidade analisar se o decanoato de nandrolona, um dos EAA mais utilizados em academias, altera a expressão do mRNA de VEGF no músculo de ratos após sete semanas de treinamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico dos esteróides anabólicos androgênicos

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAA) são derivados sintéticos do hormônio masculino testosterona. A testosterona é sintetizada e secretada pelas células intersticiais de Leydig nos testículos. Sua secreção ainda na fase embrionária é determinada pelo cromossomo masculino e determina a formação das características sexuais primárias como a formação do pênis e da bolsa escrotal, além da próstata, vesículas seminais e ductos genitais masculinos. Além disso, a testosterona suprime a formação dos órgãos genitais femininos (GUYTON; HALL, 2002). Após o nascimento, não há produção de testosterona que somente volta a ser produzida durante a puberdade, por volta dos 10 a 13 anos. Nesse período, a produção de testosterona aumenta rapidamente, sob o estímulo dos hormônios gonadotrópicos da hipófise anterior e determina as características sexuais secundárias como a distribuição típica dos pêlos no homem, a voz torna-se mais grave, e aumento da incidência de acne. Esses efeitos citados anteriormente são considerados os efeitos androgênicos da testosterona; ela ainda atua no aumento da massa muscular, pelo aumento da síntese de proteínas, produz um efeito no crescimento ósseo, aumentando a quantidade de matriz óssea e a deposição de sais de cálcio, bem como no aumento do número de eritrócitos. Esses efeitos são listados como efeitos anabólicos da testosterona (GUYTON; HALL, 2002).

Por volta de 1900 várias tentativas foram realizadas para a obtenção de uma substância com o mesmo potencial da testosterona. No final da década de 20 um extrato de testosterona ativo se tornou disponível e a produção dos androgênios sintéticos foi possível em 1935 (HARTGENS; KUIPERS, 2004; LISE et al, 1999). Durante a 2ª Guerra Mundial foi utilizada pelas tropas alemãs para aumentar a agressividade dos soldados. Seu uso terapêutico nesse período restringia-se ao tratamento de pacientes queimados, deprimidos ou em recuperação de grandes cirurgias. Na década de 50, foi utilizada sob a forma oral e injetável no tratamento de alguns tipos de anemia, em doenças com perda muscular e ainda em pacientes pós-cirúrgicos para diminuir a atrofia muscular secundária (LISE *et al*, 1999).

Em 1939 foi sugerido que a administração dos EAA poderia melhorar o desempenho de atletas. O primeiro caso documentado do uso de esteróides anabólicos no esporte ocorreu em 1954 no campeonato mundial de levantamento de peso em Viena por atletas russos (HARTGENS; KUIPERS, 2004; LISE et al, 1999; MOTTRAM; GEORGE,

2000). O uso dessas substâncias tornou-se difundido, principalmente nos Estados Unidos onde vários atletas passaram a se utilizar da droga para vencer competições. Nesse período o abuso no uso dessas drogas no esporte começou a se espalhar e até a década de 70 não havia métodos efetivos disponíveis para a detecção dessas substâncias (MOTTRAM; GEORGE, 2000; THIEN et al, 1995). Em 1968 o Comitê Olímpico Internacional (COI) introduziu a definição de doping e desenvolveu uma lista de substâncias proibidas. Com o aperfeiçoamento nas técnicas de detecção dos EAA, usando espectrometria de massa e cromatografia de gases, eles puderam ser diferenciados dos hormônios endógenos e em 1976 eles foram adicionados à lista das substâncias banidas pelo COI. Isso resultou na desclassificação de 19 atletas nos jogos Pan-americanos de 1983, além do resgate de medalhas em jogos olímpicos, como a da medalha de ouro do atleta canadense Ben Johnson nas olimpíadas de Seul em 1988 (DAWSON, 2001; MOTTRAM; GEORGE, 2000; THIEN et al, 1995).

Entretanto o abuso dessas substâncias não está limitado aos atletas de elite, mas é também uma prática comum entre os atletas amadores e os ditos recreacionais, aqueles que freqüentam academias de musculação. Tem se tornado crescente os casos de dismorfia muscular, essa doença é mais freqüente em homens, mas aparece também em mulheres. Como a anorexia, a dismorfia está relacionada com a insatisfação desses indivíduos com o corpo, porém nesse caso os jovens buscam tornar seus corpos grandes e musculosos. Para tanto eles aumentam o volume e a carga de treino nas academias, controlam a dieta, mas continuam se achando pequenos e fracos. Essas pessoas evitam lugares como piscina, praia, onde seus corpos ficam expostos. Essa obsessão pelo corpo perfeito, com músculos definidos leva esses indivíduos a fazerem uso de anabolizantes (CHOI; POPE JR; OLIVARDIA, 2002; CHUNG, 2001).

## **2.2 Características farmacológicas dos EAA**

A biossíntese fisiológica de testosterona ocorre nas células de Leydig dos testículos e nas glândulas adrenais nos homens (MOTTRAM; GEORGE, 2000). As células de Leydig são estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH) hipofisário. Dessa forma a quantidade de testosterona secretada aumenta aproximadamente de forma proporcional à quantidade de LH disponível. Altos níveis de testosterona secretados podem também inibir a secreção de LH pela hipófise anterior. Essa inibição é em grande parte devida ao efeito direto

da testosterona sobre o hipotálamo, diminuindo a secreção do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH). Isso, por sua vez, causa a diminuição correspondente de LH e de hormônio foliculo-estimulante (FSH) pela hipófise anterior. Sendo assim, sempre que a secreção de testosterona estiver alta ocorrerá esse efeito de retroalimentação negativa, operando através do hipotálamo e da hipófise anterior a fim de reduzir a secreção de testosterona para os níveis desejados. Por outro lado, quando as concentrações plasmáticas de testosterona são baixas, o hipotálamo é estimulado para secretar GnRH, com aumento correspondente na secreção de LH e FSH e conseqüente aumento da secreção de testosterona pelos testículos. Nas mulheres há uma pequena produção desses hormônios apenas pelas glândulas adrenais (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

A testosterona é um hormônio esteróide sintetizado a partir da molécula de colesterol que, após várias oxidações formará a pregnolona. Esta é o principal precursor da testosterona e durante a conversão, ocorre a formação de desidroepiandrosterona (DHEA) e de androstenediona (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002). Posteriormente a testosterona é convertida, através de uma reação de redução, em  $5\alpha$ -diidrotestosterona (DHT). A DHT é produzida no trato reprodutivo e no cérebro pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase e possui propriedades androgênicas. As genitálias externas, a próstata, as vesículas seminais e o crescimento secundário de pelos são mais sensíveis ao DHT do que a testosterona. A testosterona e alguns dos seus derivados sintéticos podem ser convertidos em estradiol pela enzima aromatase no cérebro e no tecido adiposo (MOTTRAM; GEORGE, 2000; SHAHIDI, 2001).

A testosterona é transportada pela corrente sanguínea por proteínas carreadoras, do sítio de produção até os tecidos-alvo, aonde penetra pela membrana das células, se liga a receptores androgênicos citoplasmáticos, e então, no núcleo ativa os chamados elementos de resposta ao androgênio localizados em cromossomos responsivos e leva a mudanças na expressão gênica e no metabolismo (MOTTRAM; GEORGE, 2000).

A concentração plasmática de testosterona no homem adulto normal varia de 300 a 1.000 ng/dl e a taxa de produção diária está entre 2,5 e 11 mg. A meia vida da testosterona livre é de 10-21 minutos, no fígado ela é convertida de volta em androstenediona e seus metabólitos (epiandrosterona, androsterona ou etiocolanona) são excretados na urina (MOTTRAM; GEORGE, 2000; SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

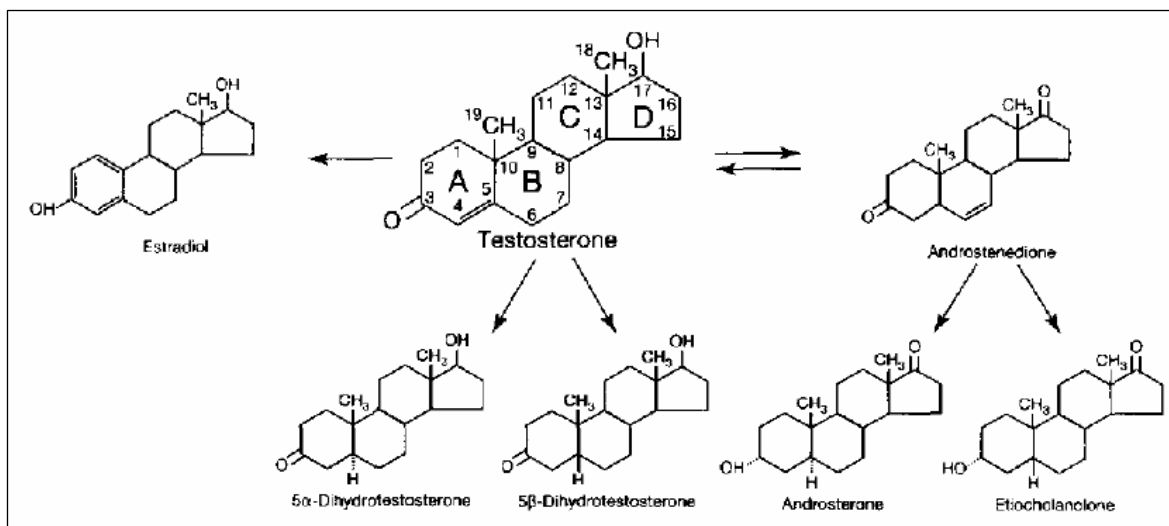


Figura 1. Biotransformação da testosterona. A figura ilustra as principais transformações sofridas pela molécula de testosterona no organismo (SHAHIDI, 2001).

Os esteróides anabólicos sintéticos são todos derivados da testosterona e atuando nos receptores androgênicos provocam efeitos tanto anabólicos como androgênicos. Eles são produzidos por indústrias farmacêuticas, mas existem também laboratórios ilegais que garantem a comercialização dessas drogas no chamado “mercado negro” (LISE et al, 1999). Mais de 100 esteróides sintéticos vem sendo desenvolvidos. A manipulação da molécula de testosterona por esses laboratórios tem como finalidade formar compostos com maior atividade anabólica do que androgênica. As modificações estruturais geraram três grupos de derivados. O grupo A é composto pelos ésteres do grupo 17 $\beta$  (cipionato de testosterona, propionato, enantato e undecanoato), e a esterificação retarda a sua liberação para a circulação, prolongando sua ação. Todos esses compostos exceto undecanoato devem ser administrados na forma injetável. Ésteres de nandrolona 17 $\beta$ -esterificados também são comercialmente disponíveis. No grupo B estão os alquilados na posição 17 $\alpha$  (metiltestosterona, metandrostenolona, nortrandolona, fluoximesterona, danazol, oxandrolona e estanozol), derivados que resistem ao metabolismo hepático, portanto são ativos quando administrados oralmente. A modificação está associada a níveis elevados de hepatotoxicidade. O grupo C compreende os que sofreram alterações nos anéis A, B ou C da molécula de testosterona. Estas modificações conferem a esses EAA características tais como: lenta metabolização, afinidade aumentada pelo receptor androgênico e resistência à formação de estradiol pela reação de aromatização (CUNHA et al, 2004; KUHN, 2002; LISE et al, 1999; SHAHIDI, 2001).

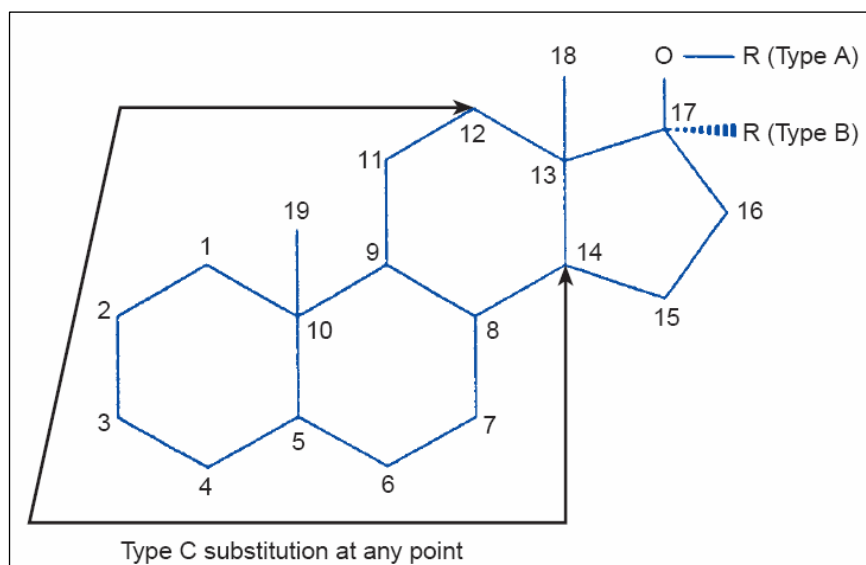


Figura 2. Grupos de EAA. A figura mostra as principais transformações na molécula de testosterona que originam seus derivados sintéticos. Os EAA do tipo A são do grupo dos  $17\beta$ -esterificados, os do tipo B formam o grupo dos  $17\alpha$ -alquilados e os do tipo C são os que sofrem alterações nos anéis A, B e C da molécula original (MOTTRAM; GEORGE, 2000).

Um dos esteróides anabólicos mais utilizados é o decanoato de nandrolona que começou a ser comercializado em 1962. Essa substância é formada pela esterificação de um grupo  $17\alpha$ -hidroxil com o ácido decanóico, um ácido graxo de cadeia longa. Essa droga é liberada lentamente na corrente sanguínea após sua injeção intramuscular, exercendo sua atividade anabólica ótima acima de seis a sete dias. Ela possui grande atividade anabólica e sua atividade androgênica é menor do que a da testosterona (CUNHA et al, 2004; MOTTRAM; GEORGE, 2000; SHAHIDI, 2001). O decanoato de nandrolona é classificado como não-aromatizável, devido a sua baixa taxa de conversão a estrogênio, reduzindo os efeitos feminilizantes indesejáveis recorrentes do uso prolongado ou em doses suprafisiológicas desse esteróide (CUNHA et al, 2004; KUHN, 2002; MOTTRAM; GEORGE, 2000).

### 2.3 Indicações terapêuticas dos EAAs

No final da 2ª Guerra Mundial os androgênios eram utilizados no tratamento de pacientes em condições terminais ligadas a debilidade crônica, e ainda em queimaduras, na depressão e em períodos pós-operatórios.

A administração de EAA é indicada, segundo a FDA (Food and drug



administration), no tratamento de hipogonadismo nos homens para o aumento da concentração de testosterona e derivados essenciais ao desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas (BHASIN; BREMNER, 1997; CUNHA et al, 2004; SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002). O hipogonadismo pode ocorrer devido à disfunção nas gônadas (hipogonadismo primário) ou no eixo hipotálamo-hipofisário (hipogonadismo secundário) (GOMES et al, 2005). O tratamento com essas substâncias é recomendado também nos casos de puberdade e crescimento retardados, micropênis neonatal, deficiência androgênica parcial em homens idosos ou no tratamento da deficiência androgênica secundária a doenças crônicas (BHASIN; BREMNER, 1997; CUNHA et al, 2004; SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

Alguns cientistas têm estudado o efeito do uso de baixas doses de esteróides anabólicos por via transdérmica para o tratamento de doenças cardiovasculares. Eles demonstraram que essas substâncias podem ter efeitos antiaterogênicos e como agentes antianginosos. Entretanto esses estudos não são ainda conclusivos (ENGLISH et al, 2000).

Os EAA têm sido utilizados no tratamento da sarcopenia relacionada a pacientes HIV-positivos, hipogonadais e eugonadais. Esses estudos observaram que o uso dessas substâncias foi efetivo para o aumento da massa muscular, restaurando a libido e a energia e aliviando o temperamento depressivo desses indivíduos (GRINSPOON et al, 2000; RABKIN; WAGNER; RABKIN, 2000). Eles são também utilizados no tratamento de sarcopenia em pacientes que recebem diálise. Além da perda de massa muscular esses pacientes sofrem de fadiga e subnutrição. O uso de EAA nesses indivíduos levou ao aumento da massa corporal magra, a redução significativa no sintoma de fadiga com a diminuição do tempo em que esses pacientes levavam para caminhar e subir escada (JOHANSEN; MULLIGAN; SCHAMBELAN, 1999).

Um dos efeitos do EAA é o aumento na produção de células vermelhas do sangue (eritropoiese) e com isso são utilizados no tratamento de diversos tipos de anemia aplástica, refratária, por falência da medula óssea, mielofibrose e em doenças renais. Eles podem também ser utilizados no tratamento de insuficiência renal aguda, pois diminuem a produção de uréia e reduzem a necessidade de se realizar diálises diárias nesses pacientes (LISE et al, 1999; NAVARRO et al, 2002).

## 2.4 Forma de uso por atletas

Os EAA podem ser administrados por via oral, via injeção intramuscular e existem ainda alguns na forma de géis e cremes que são aplicados na pele. Atletas que fazem uso dessas substâncias geralmente utilizam doses de 10 a 100 vezes maiores do que aquelas administradas em condições terapêuticas (LISE et al, 1999; SANTOS, 2007).

Alguns termos se tornaram comuns entre os atletas que fazem uso de esteróides anabólicos, decorrentes da experiência prática e não de pesquisas científicas. A acumulação ou combinação (stacking) se refere ao uso de duas ou mais drogas ao mesmo tempo geralmente em ciclos balanceados de cada uma delas. O termo “ciclando” trata-se do período que o esteróide está sendo usado, e corresponde ao ciclo, intervalo de tempo e a dosagem. Os atletas geralmente fazem ciclos de 4 a 12 semanas. Alguns ajustes são feitos durante o ciclo para evitar a estabilização de uma ou duas drogas, muitas vezes eles optam pelo abandono, substituindo por outra. A diminuição se refere à redução gradativa e “segura” para a finalização de um ciclo, de modo que o corpo volte aos poucos a produzir naturalmente a testosterona. (BERNSTEIN; SAFIRSTEIN; ROSEN, 2003-2004; CALFEE; FADALE, 2006; EVANS, 2004; SANTOS, 2007).

Para evitar a detecção nos testes antidoping, as técnicas mais utilizadas são: a) o empilhamento, quando há a utilização de mais de uma droga concomitantemente e/ou a combinação do uso oral e injetável; b) a pirâmide, em que o esteróide anabólico é iniciado em baixa dosagem com aumento até 10-100 vezes do valor inicial atingindo um pico, com retorno gradual as doses iniciais; c) os ciclos, onde há o uso por seis a doze semanas, interrupção por três a quatro semanas e repetição do ciclo com suspensão do uso com algumas semanas antes da competição; e d) mista, uma combinação dessas técnicas (LISE et al, 1999; SANTOS, 2007).

Algumas vezes antes, durante ou após um ciclo, os usuários fazem uso de algumas substâncias com a intenção de reverter os efeitos colaterais dos EAA. Entre elas estão: Novaldex, um antiestrógeno, para evitar a aromatização dos esteróides e conseqüentemente o efeito de ginecomastia; Profasi (gonadotrofina coriônica humana), com a função de estimular, no final do ciclo, a produção natural de testosterona e evitar a atrofia dos testículos; *Evening primrose oil*, rico em gorduras essenciais ao fígado, que são depletadas com o uso de esteróides; Proviron, também utilizada na tentativa de redução da ginecomastia (SANTOS, 2007).

## 2.5 Efeitos desejáveis dos EAA

Os fisiculturistas usam esteróides anabólicos com a finalidade de aumentarem sua massa muscular e diminuir a gordura corporal. Os levantadores de peso desejam aumentar sua força com o objetivo de suspender a maior quantidade de peso possível. Os nadadores e corredores esperam ser capazes de executar suas tarefas de maneira freqüente, em alta intensidade e longa duração sem que haja prejuízos ao organismo. De uma forma geral, atletas de diferentes modalidades de esporte fazem uso dos EAA procurando melhorar o desempenho para as tarefas que lhes são requeridas (BAHRKE; YESALIS, 2004).

Os EAA agem nos receptores androgênicos no citoplasma das células dos tecidos-alvo. A ligação dessas moléculas aos receptores provoca efeitos anabólicos e androgênicos nesses tecidos. Os efeitos anabólicos são os requeridos pelos usuários de EAA, porém os efeitos androgênicos não estão dissociados dessas substâncias (LISE et al, 1999). A concentração dos receptores androgênicos varia de um grupo muscular para outro. Em humanos os músculos da parte superior dos braços, peito e costas, são mais responsivos ao EAA do que outros músculos (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

Entre os efeitos anabólicos dos EAA estão: o aumento da massa muscular, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, da retenção de nitrogênio, da reposição de cálcio nos ossos e diminuição das reservas de gordura do corpo (LISE et al, 1999). Drente os mecanismos anabólicos responsáveis pelo aumento da massa muscular estão: aumento da síntese protéica via RNA mensageiro; o aumento da força de contratilidade da célula muscular pelo armazenamento de fosfocreatina; o balanço nitrogenado positivo; aumento da retenção de glicogênio no músculo; maior captação de aminoácidos importantes na construção da massa muscular; e bloqueio da ação do cortisol, hormônio catabólico liberado por fatores de estresse (LISE et al, 1999; SANTOS, 2007).

Estudos bioquímicos e anatômicos mostraram que os EAA influenciam significativamente a morfologia e bioquímica do músculo em humanos. O peso corporal de fato aumenta após o uso de EAA e isso se deve em parte pelo aumento na massa corporal magra, mas também é um reflexo da retenção de água (KUHN, 2002).

A principal razão para o uso de EAA por atletas é para o incremento na força e na massa muscular. Bhasin e colaboradores (1996) estudaram os efeitos da administração de testosterona exógena, com ou sem acompanhamento de um programa treinamento de força, no tecido muscular de homens eugonadaís. Através do uso da medida de imagens de ressonância magnética eles observaram que dez semanas de administração de testosterona

(600 mg/semana) poderia levar a um acréscimo da área dos músculos bíceps braquial e quadríceps. Os ganhos na massa muscular foram maiores quando a administração da testosterona foi combinada com o treino de força. Em outro estudo, diferentes dosagens de testosterona (25, 50, 125, 300 e 600 mg/semana) foram administradas por dez semanas em voluntários não treinados. Os efeitos encontrados no volume do músculo quadríceps foi dose dependente (BHASIN et al, 2001).

Como já foi descrito, a administração de EAA aumenta a concentração de hemoglobina no soro (HARTGENS; KUIPERS, 2004). Alén (1985) descreveu o aumento da concentração de hemoglobina no soro, do hematócrito, do número de células sangüíneas brancas e plaquetas em atletas após seis meses de administração de EAA em altas doses. Entretanto não foi relatado o aumento no desempenho de atletas de endurance com o uso de EAA. Um estudo em ratos mostrou que a administração de decanoato de nandrolona associada ao treino em esteira não melhorou o desempenho, o VO<sub>2</sub> máximo e a capacidade do sangue em transportar o oxigênio não foram alteradas (GEORGIEVA; BOYADJIEV, 2004).

## **2.6 Principais efeitos adversos dos EAA**

Apesar da insistência no relato dos efeitos nocivos à saúde do uso de EAA, há muitos relatos na literatura indicando que um número substancial de atletas aceita esse risco e continuam utilizando esse tipo de droga (HARTGENS; KUIPERS, 2004). Para Hartgens e Kuipers (2004) a maioria dos estudos não foi capaz de extrapolar as conseqüências do uso de EAA na vida real e esses efeitos podem ser mais pronunciados do que os demonstrados em laboratório. Os efeitos adversos provocados pelo uso de EAA estão relacionados ao tipo de substância utilizada, a dose, frequência de uso, a idade, e o uso concomitante de várias dessas drogas. (BAHRKE; YESALIS, 2004; MARAVELIAS et al, 2005). Estudos em laboratório e clínicos têm mostrado sérias mudanças nos fatores de risco para doenças cardiovasculares, tumores no fígado e infertilidade, e ainda alterações fisiológicas de diversos órgãos e sistemas, sugerindo possíveis problemas de saúde subseqüentes. Efeitos psíquicos e de comportamento, alterações na próstata e na função imune também são áreas pesquisadas (BAHRKE; YESALIS, 2004).

### **2.6.1 Efeitos no sistema reprodutivo**

Visto que os EAAs são derivados da testosterona eles exercem efeitos importantes no sistema reprodutivo e nos hormônios sexuais. A administração de EAAs provoca distúrbio na produção endógena de testosterona e gonadotrofinas (LH e FSH). A supressão da produção desses hormônios induz a atrofia testicular, reduz a produção e a qualidade do sêmen, e também a quantidade e mobilidade dos espermatozóides. Alguns tipos de EAA podem sofrer aromatização em estrogênio e produzir ginecomastia (desenvolvimento da mama) em homens (BAHRKE; YESALIS, 2004; EVANS, 2004; HARTGENS; KUIPERS, 2004; MARAVELIAS et al, 2005). Nas mulheres o uso de EAA causa alguns efeitos masculinizantes como, aumento de pêlos faciais, engrossamento da voz, hipertrofia do clitóris, alterações no ciclo menstrual, queda de cabelo, redução dos seios, hirsutismo (crescimento de pêlos em locais caracteristicamente masculinos). Alguns desses efeitos se tornam irreversíveis mesmo após a suspensão do uso (BAHRKE; YESALIS, 2004; EVANS, 2004; HARTGENS; KUIPERS, 2004; MARAVELIAS et al, 2005).

### **2.6.2 Efeitos hepáticos**

A estrutura e a função do fígado são alteradas pelo uso dos EAAs. As disfunções hepáticas estão normalmente associadas com os esteróides 17- $\alpha$  alquilado que são formas de administração oral e a extensiva metabolização dessas formas leva a significantes efeitos hepatotóxicos. Há o aumento no risco de hepatite peliosis, essa forma rara de hepatite é caracterizada pela formação de múltiplos cistos cheios de sangue dentro do fígado, os quais podem ser fatais. A icterícia colestática pode ocorrer ocasionalmente com o uso de esteróides, mas pode ser resolvida após a suspensão do uso da droga. Alguns óbitos entre atletas com histórico de uso extensivo de EAAs já ocorreram devido ao aparecimento de carcinoma hepatocelular ou da ruptura de tumores hepáticos (BAHRKE; YESALIS, 2004; MARAVELIAS et al, 2005; VELAZQUEZ; ALTER, 2004; THEIN; THEIN; LANDRY, 1995).

### **2.6.3 Efeitos cardiovasculares**

O abuso de EAA tem sido associado com a ocorrência de sérios efeitos cardiovasculares, incluindo o desenvolvimento de cardiomiopatias, fibrilação atrial, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, distúrbios do sistema hemostático, trombose

ventricular e embolia sistêmica, e falência aguda do coração. As pesquisas têm focado na avaliação dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão, alteração do perfil lipoprotéico, e no exame da estrutura e do funcionamento cardíaco para avaliar como os EAA podem afetar o sistema cardiovascular (HARTGENS; KUIPERS, 2004).

Vários estudos têm demonstrado significativa diminuição nos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) e aumento nos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) com o uso de EAA. A diminuição dos níveis de HDL se deve a ação da enzima HTGL (triglicerídeo lipase hepática), que regula os lipídios do sangue (HARTGENS; KUIPERS, 2004; SHAIDI, 2001). Hartgens et al. (2004) relataram que a administração de vários EAA simultaneamente, durante 14 semanas, produziu profundos efeitos desfavoráveis nos lipídios e lipoproteínas, levando a um aumento no perfil lipídico aterogênico. Essas mudanças persistem ainda após a interrupção do uso e a normalização depende do tempo de utilização dessas drogas.

A hipertensão tem sido relacionada com o uso de EAA, porém os dados da literatura ainda são inconclusivos. O aumento da pressão arterial que ocorre nesses casos parece ser pequeno e transitório, indicando que o impacto na saúde dos atletas pode ser pequeno (HARTGENS; KUIPERS, 2004; URHAUSEN; ALBERS; KINDERMANN, 2004). O uso de esteróides anabólicos tem sido relacionado a mudanças irreversíveis no miocárdio tais como a hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo. Nieminen et al. (1996) analisando quatro pacientes os quais treinavam e fizeram uso de EAA por muitos anos, encontraram em todos eles hipertrofia cardíaca anormal. Em dois casos dos quais eles fizeram biópsia foi encontrada uma fibrose difusa no miocárdio. Dois dos pacientes apresentavam sinais de insuficiência cardíaca, e outros dois mostraram falha no fluxo ou perfusão coronária. Foram verificados também dois diferentes efeitos adversos potencialmente letais, arritmia ventricular maligna e trombose cardíaca.

#### **2.6.4 Efeitos psicológicos e comportamentais**

A testosterona per se não causa mudanças no comportamento. Ela pode alterar a probabilidade de um comportamento particular ocorrer na presença de um estímulo específico. Os hormônios sexuais podem influenciar regiões do sistema nervoso central (SNC) os quais contem receptores de hormônios. Os androgênios têm um papel crítico no comportamento masculino, embora isso seja profundamente influenciado por fatores intrapsíquicos, sociais, somáticos e culturais (CHRISTIANSEN, 2001). Os principais efeitos psicológicos relacionados aos EAA já relatados são agressividade, euforia, depressão, alterações no humor e na libido, e até alucinações (psicose) (MARAVELIAS, 2005; THEIN; THEIN; LANDRY, 1995). O aumento na agressividade parece ser dose dependente e os efeitos podem não ser uniformes em todos os indivíduos (CHRISTIANSEN, 2001; POPE Jr; KOURI; HUDSON, 2000).

A suspensão do uso de EAA pode levar a alguns sintomas de dependência como ansiedade, irritabilidade, insônia, calor intenso, suor, calafrios, anorexia, náusea, vômito, taquicardia, hipertensão e acredita-se que esteja relacionado com a interrupção após o uso em altas doses (MARAVELIAS, 2005).

#### **2.6.5 Efeitos músculoesqueléticos**

O uso de substâncias androgênicas em crianças pode levar ao fechamento prematuro das epífises o que resultaria na diminuição do crescimento e conseqüentemente da altura na idade adulta (SHAHIDI, 2001).

O aumento de danos no músculo e no tendão tem sido notado em usuários de EAA. Acredita-se que a sobrecarga nos tendões causada pelo aumento da força muscular com o uso de EAA e o treinamento pode levar a ruptura do tendão (MARAVELIAS et al, 2005). Além disso, o uso de esteróides combinado com o treinamento pode causar alterações estruturais e biomecânicas no tendão (VISURI; LINDHOLM, 1994). Vários trabalhos têm relatado casos de rompimento do tendão em atletas que usaram EAA por longos períodos. David et al. (1995) em um estudo de caso relataram o rompimento dos tendões de ambos músculos quadríceps de um fisiculturista que confirmou ter administrado EAA em doses muito maiores do que as indicadas para uso terapêutico. Visuri e Lindholm (1994) encontram também um paciente com ruptura do tendão distal do músculo bíceps braquial. Esse indivíduo

foi fisiculturista e se auto-administrava um coquetel de compostos anabólicos em alta dosagem e por longo período.

## **2.7 Estrutura e composição dos músculos esqueléticos**

Os músculos estriados esqueléticos são formados por feixes de células cilíndricas, muito longas e multinucleadas que apresentam estriações transversais e com um diâmetro que varia de 10 a 100 micrômetros, chamadas fibras musculares. As células musculares têm origem mesodérmica e sua diferenciação ocorre principalmente devido a um processo de alongamento gradativo, com simultânea síntese de proteínas filamentosas. Em um músculo, os feixes de fibras musculares estão agrupados organizadamente em feixes envolvidos por uma membrana externa de tecido conjuntivo, chamado epimísio. Dele partem septos muito finos de tecido conjuntivo, que se dirigem para o interior do músculo, dividindo-o em fascículos. Esses septos são denominados perimísio. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada muito fina de fibras reticulares formando o endomísio. As fibras musculares se adelgaçam nas extremidades, observando-se a transição gradual de músculo para tendão. Os vasos sanguíneos penetram no músculo através dos septos de tecido conjuntivo e formam uma rica rede de capilares que correm entre as fibras musculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

O tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro, contribuindo para a sua contração. Por intermédio do tecido conjuntivo a força de contração do músculo se transmite a outras estruturas como tendões, ligamentos, aponeuroses e ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).



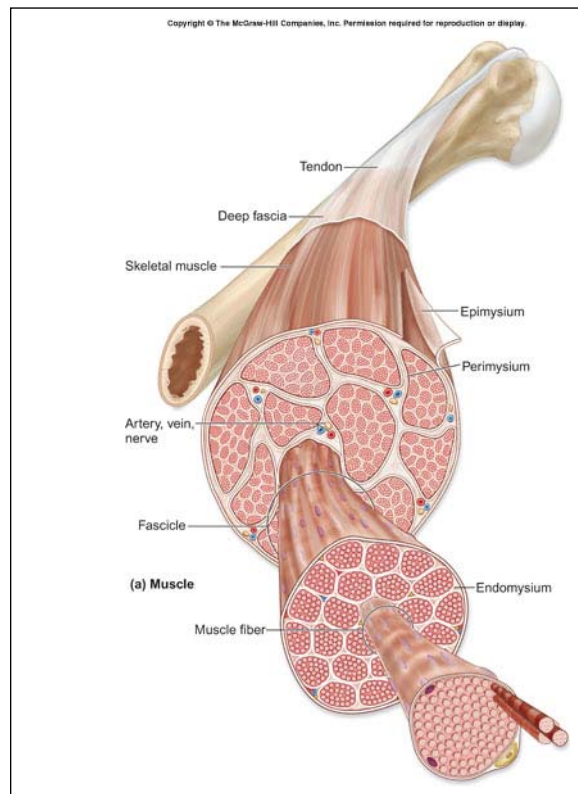


Figura 3. Estrutura hierárquica do músculo esquelético. Relação entre as fibras musculares, os feixes de fibras musculares e o músculo. Essas estruturas são delimitadas respectivamente pelas membranas denominadas endomísio, perimísio e epimísio.

([http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201\\_McKinley/f10-1a\\_structural\\_organ\\_c.jpg](http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/f10-1a_structural_organ_c.jpg)).

A fibra muscular é delimitada por uma membrana, o sarcolema, e seu citoplasma apresenta-se preenchido principalmente por fibrilas paralelas, as miofibrilas. Estas estruturas são cilíndricas, apresentam um diâmetro de 1 a 2  $\mu\text{m}$  e correm longitudinalmente à fibra muscular. Ao microscópio óptico aparecem com estriações transversais pela alternância de faixas claras, não coradas com hematoxilina e escuras, coradas com hematoxilina. Ao microscópio de polarização, a faixa escura é anisotrópica, duplamente refratável (birrefringente), e recebe o nome de banda A, enquanto a faixa clara, ou banda I, é isotrópica, refratável uma única vez. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura, o disco Z. A estriação da miofibrila é devida à repetição de unidades iguais, chamadas sarcômeros. Cada um deles é formado pela parte da miofibrilas que fica entre dois discos Z

sucessivos e contém a banda A separando duas semibandas I. No centro da banda A pode ser observada uma zona mais clara, a banda H. O estudo do sarcômero ao microscópio eletrônico revela que o modo acima descrito é devido, principalmente, à presença de dois tipos de filamentos, dispostos longitudinalmente ao eixo mais longo das miofibrilas e organizados numa distribuição simétrica e paralela. Do disco Z, partem filamentos muito finos que correm até a borda externa da banda H. Outro tipo de filamento, mais grosso, ocupa a região central escura do sarcômero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

As miofibrilas do músculo estriado contêm pelo menos quatro proteínas principais: miosina, actina, tropomiosina e troponina. A primeira forma os filamentos grossos e as três últimas formam os filamentos finos.

A actina apresenta-se sob a forma de estruturas longas e fibrosas (actina F) formada por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcida uma sobre a outra, em dupla hélice. As moléculas de actina G possuem assimetria estrutural e quando elas se polimerizam para formar a actina F, a frente de um monômero combina-se com a parte posterior do outro, produzindo um filamento polarizado. Cada monômero globular de actina G possui uma região onde a miosina pode se combinar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

A tropomiosina é uma molécula longa e fina, polarizada, contendo duas cadeias polipeptídicas em  $\alpha$ -hélice, uma enrolada na outra. As moléculas de tropomiosina unem-se umas às outras pelas extremidades para formar filamentos longos que se localizam sobre as subunidades de actina, ao longo do sulco existente entre os filamentos de actina F. Nos filamentos finos uma molécula de tropomiosina envolve sete moléculas de actina G e tem um complexo de troponina preso a sua superfície (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

A troponina é um complexo de três subunidades: TnT (troponina T), que se liga fortemente à tropomiosina; TnC (troponina C) que tem grande afinidade pelos íons cálcio; e TnI (troponina I), que inibe a interação entre a actina e a miosina e tem alta afinidade pela actina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

A molécula de miosina tem a forma de bastão com 20 nm de comprimento e 2-3 nm de diâmetro, sendo formada por dois peptídeos enrolados em hélice, ao longo de toda a extensão da molécula. Em uma de suas extremidades a miosina apresenta uma saliência globular ou cabeça, que possui locais específicos para a combinação com ATP e é dotada de atividade ATPásica. Nessa região se encontra o local de combinação com a actina. Se for tratada por enzimas proteolíticas, a molécula de miosina é clivada em duas porções: um fragmento de meromiosina leve e uma fração de meromiosina pesada. O fragmento leve

corresponde à maior parte da porção em bastão da molécula, enquanto a pesada contém a saliência globular mais uma pequena parte do bastão. As moléculas de miosina são dispostas nos filamentos grossos de tal maneira que suas partes em bastão se sobrepõem e as cabeças situam-se para fora. Imagens de microscopia eletrônica mostram a presença de pontes transversais entre os filamentos finos e grossos. Essas pontes são formadas pela cabeça da miosina mais um pequeno segmento da parte alongada da molécula, denominado braço. A ATPase das cabeças da miosina está envolvida diretamente na transdução da energia química em energia mecânica, durante a contração muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

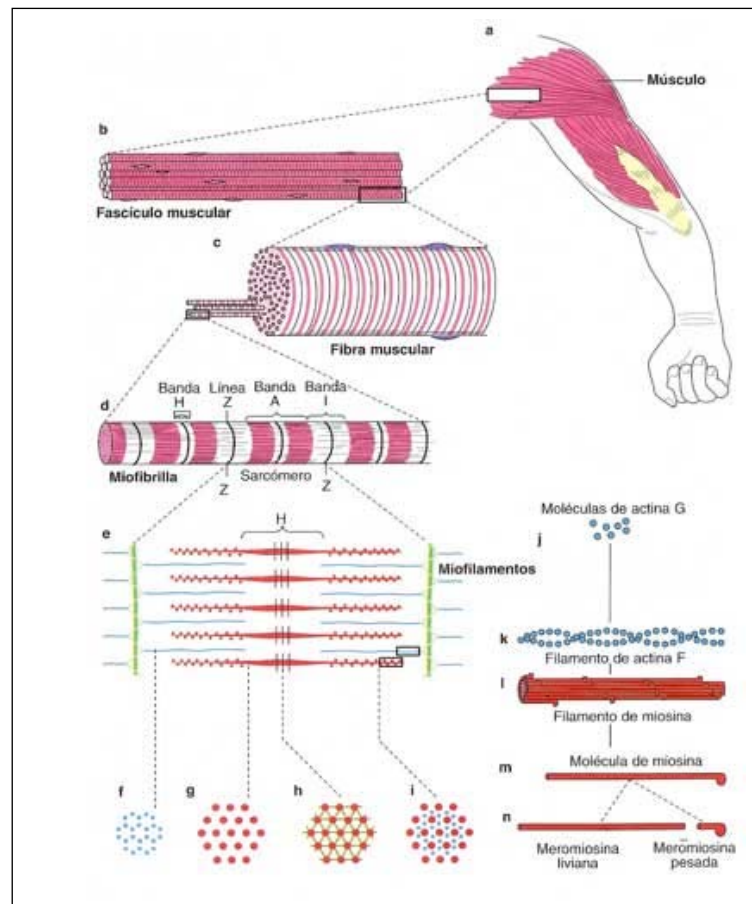


Figura 4. Estrutura da fibra muscular. Fibra muscular organizada em unidades funcionais denominadas, sarcômeros (d, e). A fibra muscular é composta por proteínas contráteis: actina (j, k) e miosina (l, m, n) (GUYTON; HALL, 2002).

## 2.8 Tipos de fibras musculares

Existem diversas maneiras de classificar as fibras musculares de acordo com o método empregado para sua análise. Um dos métodos mais populares para separar as fibras em grupos é baseado na sensibilidade da enzima adenosina trifosfatase miofibrilar (mATPase) ao pH. Para tanto é utilizado o método histoquímico que permite classificá-las nos tipos I ou II, com seus subtipos IIA e IIB (MINAMOTO, 2005; STARON, 1997).

As fibras do tipo I geram energia para a ressíntese do ATP predominantemente através do sistema aeróbio de transferência de energia, e, portanto possui muitas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons) (KARP, 2001; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001). Essas fibras possuem ainda atividade relativamente lenta de miosina ATPase, mitocôndrias grandes e numerosas, grandes estoques de triglicerídeos e têm menor capacidade de manipulação do cálcio. As mitocôndrias grandes e numerosas combinadas aos altos níveis de mioglobina conferem às fibras do tipo I sua pigmentação avermelhada característica. Elas receberam a designação de fibras LO (lentas-oxidativas) para descrever sua velocidade de encurtamento lento e sua dependência do metabolismo oxidativo. Elas são recrutadas seletivamente em atividades aeróbicas, são mais resistentes à fadiga e requerem um baixo nível de produção de força (KARP, 2001; McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

As fibras do tipo II apresentam grande atividade quando colocadas em meio básico. Elas possuem alta capacidade para a transmissão eletroquímica dos potenciais de ação, alta atividade de miosina ATPase, seu retículo sarcoplasmático é eficiente promovendo a liberação e captação rápidas dos íons cálcio (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001; MINAMOTO, 2005). Todos esses fatores contribuem para a geração rápida de energia dessas fibras para as contrações rápidas e poderosas, por isso são denominadas fibras de contração rápida. Elas se valem de um sistema glicolítico de fornecimento rápido de energia que é gerado pelas vias anaeróbicas (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001). As fibras do tipo II são subdivididas em IIA e IIB. As fibras do tipo IIA são consideradas intermediárias, e representam a transição entre os dois extremos, as do tipo I e IIB. Estruturalmente apresenta um grande neurônio motor, alta densidade de mitocôndrias, média densidade de capilares e conteúdo médio de mioglobina. Possui ambas as atividades enzimáticas oxidativa e glicolítica com um grande estoque de fosfocreatina e glicogênio e níveis médios de triglicerídeos e

moderada resistência à fadiga. Funcionalmente as fibras do tipo IIA são recrutadas em atividades anaeróbicas longas com um trabalho de força relativamente alto. Por outro lado, as fibras do tipo IIB são muito sensíveis a fadiga e são utilizadas em atividades anaeróbicas curtas de alta produção de força. Possuem um grande neurônio motor, como as fibras do tipo IIA, porém, exibem poucas mitocôndrias, baixa densidade capilar e conteúdo pequeno de mioglobina. Elas contêm grande quantidade de enzimas glicolíticas e poucas enzimas oxidativas, os conteúdos de fosfocreatina e glicogênio são abundantes e há baixos estoques de triglicerídeos (KARP, 2001).

Através da identificação das diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (*myosin heavy chain*, MHC) pela técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos antimiosina, outras subunidades das fibras do tipo II foram determinadas. A MHC é a porção da cabeça da molécula de miosina que determina a velocidade da reação das pontes cruzadas da miosina com os filamentos de actina, e conseqüentemente, a velocidade de contração muscular. As diferentes isoformas de MHC são, portanto classificadas pelas suas diferentes atividades ATPásicas (DeNARDI et al, 1993; BALDWIN; HADDAD, 2001). Além dos tipos de fibras rápidos conhecidos, IIA e IIB foi determinada também a fibra 2X (ou IID), encontrada em abundância no músculo diafragma de ratos (DeNARDI et al, 1993; HÄMÄLÄINEN; PETTE, 1993). Essas fibras são denominadas “puras” e há também as fibras mistas, denominadas “híbridas”, IIBD, IIAD. Acredita-se que são produtos da transformação de um tipo de fibra para o outro, entretanto não há ainda uma conclusão se são de fato fibras de transição ou fibras estáveis com composição de diferentes MHC (MINAMOTO, 2005; PEUKER; PETTE, 1997).

## **2.9 Adaptações do músculo ao exercício**

Várias modificações biológicas ocorrem em resposta ao treinamento. Essas alterações são dependentes do tipo de exercício e não ocorrem exatamente da mesma forma para todos os indivíduos. O organismo passa por uma série de adaptações com exercício, porém serão descritas aqui apenas as mudanças que ocorrem no músculo esquelético em resposta ao trabalho físico.

O treinamento aeróbico produz um aumento no conteúdo e no tamanho das mitocôndrias no músculo esquelético, com o concomitante aumento nas enzimas do sistema aeróbico. Isso induz a um aumento na capacidade das mitocôndrias em gerar ATP

aerobicamente. O músculo treinado tem maior capacidade de utilizar os triacilgliceróis intramusculares como fonte primária para a oxidação dos ácidos graxos. O exercício aeróbio submáximo requer pouca utilização do glicogênio muscular. A oxidação dos ácidos graxos, combinada com um catabolismo reduzido dos carboidratos, contribui para a homeostasia da glicose sangüínea e uma maior capacidade de endurance após o treinamento aeróbico. Há também um aumento no fluxo sangüíneo total para o músculo em consequência do treinamento aeróbio. O maior débito cardíaco e o aumento na capilarização do músculo são fatores responsáveis pelo aumento do fluxo (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001). Vários estudos têm mostrado o aumento da densidade capilar no músculo esquelético com o treinamento aeróbico e esse aumento é acompanhado pelo aumento da expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator chave na indução da formação de novos vasos sangüíneos (JENSEN; BANGSBO; HELLSTEN, 2004; WATERS et al, 2004).

Os atletas de endurance altamente treinados possuem fibras de contração lenta maiores que as fibras de contração rápida existentes no mesmo músculo (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

Estudos realizados nas últimas décadas têm mostrado que ambos os treinos de endurance e força podem causar a modificação das fibras mais rápidas para isoformas de miosina mais lentas exibindo maior resistência (HAMILTON; BOOTH, 2000).

As atividades que exigem um alto nível de metabolismo anaeróbico, utilizando fibras glicolíticas, produzem alterações específicas nos sistemas de energia imediato e a curto prazo. Com esse tipo de treinamento se observa aumento significativo nos níveis de repouso do músculo de ATP, fosfocreatina e glicogênio, acompanhados por uma melhora na força muscular. Ocorre também o aumento no tamanho das fibras de contração rápida (McARDLE; KATCH; KATCH, 2001).

## **2.10 O modelo de salto**

O protocolo utilizado nesse trabalho foi baseado no proposto por Silva et al. (1999), com algumas modificações. Esses autores utilizaram um programa de exercício anaeróbico para estudar os efeitos dos mesmos na gordura sérica e tecidual de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Esse programa consistiu de 10 sessões diárias de 30 segundos de saltos, intercalados por 1 minuto de repouso, cinco dias por semana, em tanques contendo água a  $32^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , com uma sobrecarga de 50% do peso corporal dos animais. Eles

encontraram que esse tipo de exercício diminuiu significativamente a gordura tecidual e os níveis séricos de colesterol no excesso de gordura da dieta.

Nosso laboratório vem adotando esse protocolo para analisar as alterações no tendão de Aquiles, estrutura fortemente necessária nesse tipo de exercício. Foi encontrado um aumento significativo na atividade da MMP-2 (metaloprotease de matriz), proteína importante no remodelamento de vários tecidos, sugerindo que esse processo foi provavelmente acelerado, permitindo a adaptação do tendão para uma melhor resposta a intensa demanda mecânica desse exercício (MARQUETI et al, 2006). Essa mesma proteína foi analisada no músculo esquelético pelo nosso laboratório em recente estudo publicado também com o modelo de salto. A MMP-2 regula a integridade da matriz extracelular e a composição do músculo esquelético, papel essencial na proliferação e diferenciação das miofibrilas, recuperação das fibras após danos e a manutenção dos tecidos conectivos que envolvem o músculo. Foi observado que, nos músculos agonistas para o salto, como o sóleo e o gastrocnêmio houve aumento da atividade da MMP-2 com o treino. A atividade da MMP-2 não foi alterada pelo exercício nos músculos EDL e tibial anterior, que são antagonistas a esse movimento. Esses resultados sugerem que há um *turnover* maior da matriz extracelular nos principais músculos que realizam o movimento (MARQUETI et al, 2008).

Cunha et al. (2005) utilizaram protocolo semelhante para analisar a concentração de triglicerídeos no plasma, o conteúdo de glicogênio no fígado e no músculo esquelético antes e após o exercício, com e sem o uso de EAA. Eles relataram que houve aumento no conteúdo de glicogênio do fígado após o treino o que é importante uma vez que esse órgão é responsável pela manutenção da glicemia durante o exercício. Não houve influência da administração de EAA nesse parâmetro. Na análise do conteúdo de glicogênio no músculo eles não encontraram alteração desse parâmetro no músculo sóleo com o exercício. Entretanto, a administração de EAA aumentou o conteúdo de glicogênio nesse músculo. Na porção branca do músculo gastrocnêmio, o qual possui predominantemente fibras musculares glicolíticas, houve aumento no conteúdo de glicogênio com o exercício. Eles encontraram ainda uma redução significativa dos níveis de triglicerídeos no plasma em resposta ao exercício de alta intensidade, sugerindo que a oxidação dos ácidos graxos no período de recuperação após esse tipo de exercício é provavelmente influenciado pelo baixo conteúdo de glicogênio no fígado após o treino.

## 2.11 Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)

O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) compreende uma família de glicoproteínas homodiméricas de aproximadamente 45 kDa, que apresentam oito resíduos de cisteína conservados, na mesma posição, em um domínio homólogo (FERRARA, 1996; KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996; SHIBUYA, 2001; VEIKKOLA; ALITALO, 1999). Essas moléculas são potentes mitógenos para células endoteliais vasculares derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos. A família é composta, nos mamíferos, por cinco membros – VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (fator de crescimento de placenta) (FERRARA; GERBER; LECOATER, 2003; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Esses membros possuem propriedades físicas e biológicas diferentes e agem através de receptores tirosino-quinase específicos – VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3.

O VEGF-A será mais detalhadamente citado em um tópico próprio, pois é a molécula mais estudada e acredita-se que seja a mais importante na indução da angiogênese e foi utilizada para as análises realizadas nesse trabalho.

PlGF foi identificado primeiramente na placenta mas é também encontrado no coração e pulmões (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Ele se liga apenas ao VEGFR-1 e essa ligação induz a transdução de sinais intracelulares podendo produzir diferentes perfis de expressão gênica (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). PlGF pode formar heterodímeros com VEGF-A e a combinação desses fatores intensifica a angiogênese dirigida por VEGF-A (TAMMELA et al, 2005).

VEGF-B se liga ao receptor VEGFR-1 e pode formar heterodímeros com VEGF-A (OLOFSSON et al, 1996). O papel preciso de VEGF-B in vivo ainda não é bem entendido. Ele é altamente expresso no músculo estriado, no miocárdio e no tecido adiposo marrom (NASH et al, 2006).

VEGF-C é produzido como uma proteína precursora e é proteoliticamente ativado no espaço extracelular por proteases para gerar uma proteína homodimérica com alta afinidade a ambos os receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Ele induz a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais (LI; ERIKSSON, 2001). VEGF-C é sugerido como indutor da formação de vasos linfáticos durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção do endotélio linfático diferenciado em adultos (LI; ERIKSSON, 2001).

VEGF-D é proteoliticamente processado nas suas terminações N-terminal e C-



terminal e sua forma madura se liga aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 (OTROCK; MAKAREM; SHAMSEDDINE, 2007). VEGF-D é mitogênico para células endoteliais e pela sua ligação ao VEGFR-3 poderia estar envolvido na regulação e/ou diferenciação do endotélio de vasos sanguíneos e linfáticos, assim como VEGF-C (LI; ERIKSSON, 2001).

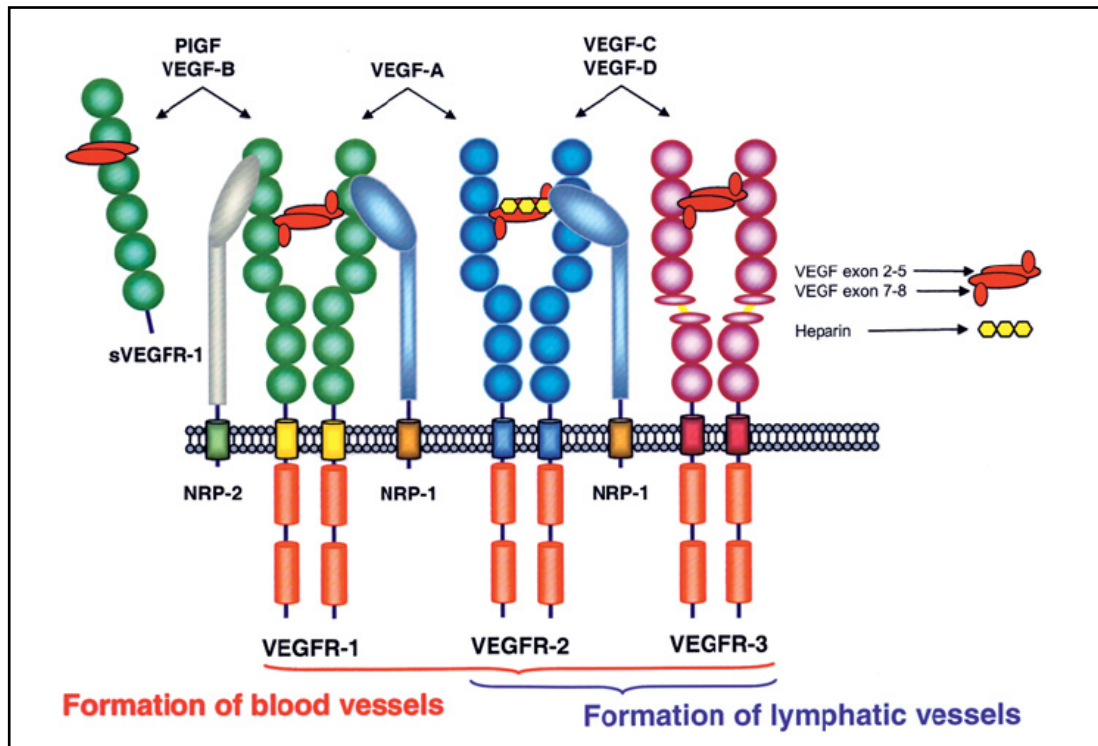


Figura 5. Especificidade d ligação dos membros da família de VEGF aos receptores de VEGF, VEGFR-1, 2 e 3. VEGF-A se liga aos receptores VEGFR-1 e 2, VEGF-B e PlGF se ligam apenas ao receptor 1 e VEGF-C e D se ligam aos receptores 2 e 3. Modificado de Cêbe-Suarez; Zehnder-Fjällman; Ballmer-Hofer, 2006.

## 2.12 VEGF-A

O VEGF-A ou apenas VEGF é a molécula chave na indução da angiogênese, ela causa a proliferação, brotamento e migração de células endoteliais. O gene de VEGF-A está localizado no cromossomo seis na banda 21.3 e é codificado por oito éxons separados por sete íntrons (FERRARA, 1996; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). VEGF se liga ao receptor VEGFR-1, com alta afinidade, e ao receptor VEGFR-2 com uma afinidade menor, porém a resposta desencadeada por essa ligação parece ser mais intensa (SHIBUYA; CLAESSION-WELSH, 2006).

VEGF foi inicialmente descrito como um fator de permeabilidade vascular.

Acredita-se que o aumento da permeabilidade se dá pela ligação do VEGF ao VEGFR-2, ativando guanilil ciclase e cGMP via um caminho dependente de óxido nítrico. O aumento nos níveis de cGMP provavelmente intensifica a permeabilidade vascular pelo aumento de organelas vesículo-vasculares, fenestrações e junções intercelulares (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

Esse fator de crescimento possui também efeito vasodilatador. VEGF induz o aumento da produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (CROSS *et al*, 2003, KROLL; WALTENBERGER, 1999). O óxido nítrico ativa a guanilil ciclase que catalisa a conversão de GTP (guanosina trifosfato) para cGMP, o qual ativa a proteína quinase cGMP- dependente. Essa quinase fosforila uma proteína reguladora para a bomba cálcio-adenosina trifosfatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) do retículo sarcoplasmático. A bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase diminui a concentração intracelular de cálcio levando ao relaxamento da musculatura lisa do vaso (SANDERS apud PECHÁŇOVÁ; ŠIMKO, 2007).

VEGF promove a sobrevivência de células endoteliais pela indução de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (CROSS *et al*, 2003). A proteína BAD, pró-apoptótica forma um complexo com Bcl-2 inativando a mesma (ALBERTS *et al*, 2002; CROSS *et al*, 2003). A ligação de VEGF ao receptor VEGFR-2 ativa uma cascata de sinalização via fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) culminando na fosforilação da BAD pela proteína Akt/PKB. Uma vez fosforilada, BAD se desliga do complexo ativando Bcl-2 e promovendo a sobrevivência dessas células (ALBERTS *et al*, 2002; CROSS *et al*, 2003).

A migração de células endoteliais requer a reorganização das proteínas do citoesqueleto como a actina. VEGF induz a migração dessas células por uma série de vias de sinalização intracelulares, incluindo Rac (pequena proteína de ligação a GTP), MAPKs (proteína quinase ativadora mitose) e FAK (quinase de adesão focal) (CROSS *et al*, 2003; OLSSON *et al*, 2006).

A ligação de VEGF ao VEGFR-2 leva a ativação de PLC-  $\gamma$  (fosfolipase-C  $\gamma$ ) que estimula a via de sinalização de PKC (proteína quinase-C) levando a geração de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e mobilizando cálcio do retículo endoplasmático. Esse caminho via PKC estimula a cascata Raf-MEK-MAP-quinase que levam a transcrição gênica para a proliferação das células endoteliais (CROSS *et al*, 2003; OLSSON *et al*, 2006; SHIBUYA; CLAESSION-WELSH, 2006).

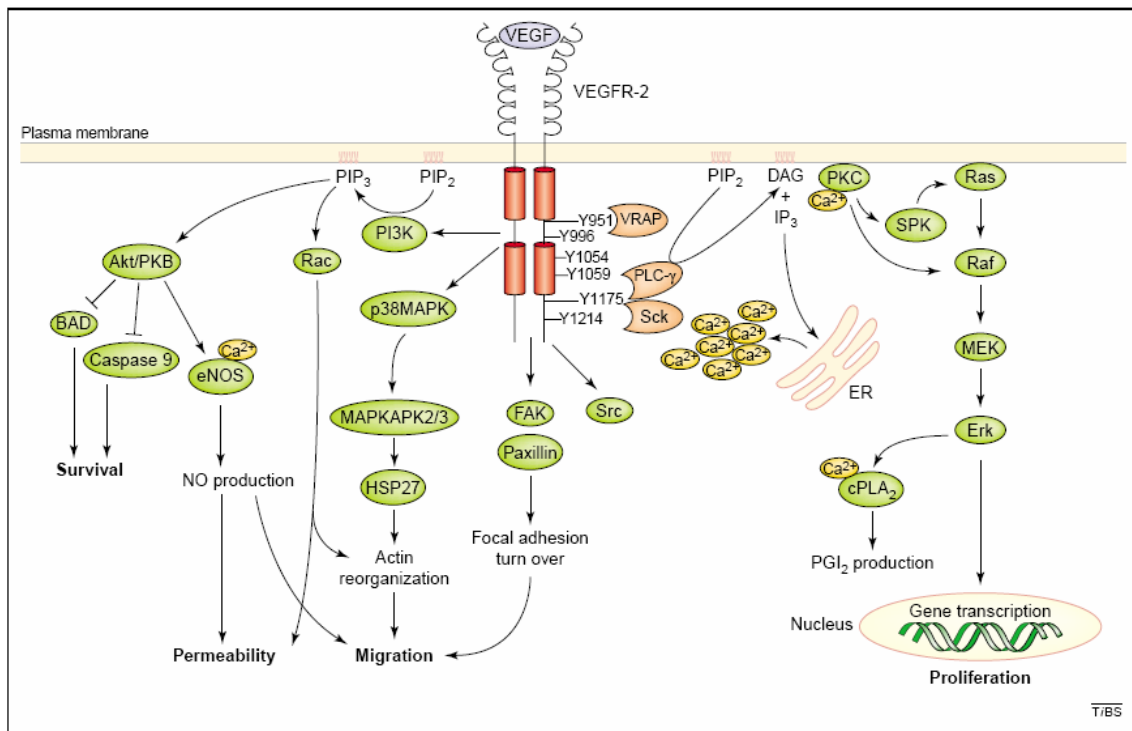


Figura 6. Sinalização celular de VEGF. A figura representa o esquema ilustrativo da sinalização intracelular de VEGF após sua ligação no domínio extracelular do receptor VEGFR-2 (CROSS et al, 2003).

Existem ao menos quatro isoformas de VEGF-A produzidas por *splicing alternativo* sendo diferentes pela presença ou ausência das seqüências codificadas pelos éxons seis e sete (FERRARA, 1996; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). São polipeptídeos de tamanhos distintos (121, 165, 189 e 206 resíduos de aminoácidos) e possuem afinidades diferentes de ligação as proteoglicanas heparana-sulfato (HSPGs) e as neuropilinas. VEGF-A<sub>121</sub> não se liga as HSPGs nem as neuropilinas sendo uma forma que se difunde livremente pelos tecidos. VEGF-A<sub>165</sub> tem propriedades intermediárias, é secretada, mas uma fração significativa permanece ligada à superfície da célula e à matriz extracelular. As isoformas 189 e 206 se ligam com alta afinidade as HSPGs ficando seqüestradas na matriz extracelular e na superfície das células. Elas precisam ser clivadas para gerarem fragmentos bioativos, por isso, parecem ser menos ativas do que as isoformas 121 e 165. Outras duas isoformas foram identificadas, mas são menos comumente encontradas, VEGF-A 145 e 183. Em ratos e camundongos são encontradas as isoformas 120, 164, 188, elas possuem um resíduo de aminoácido a menos que as formas correspondentes nos humanos (FERRARA, 1996; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006; TAMMELA et al, 2005).

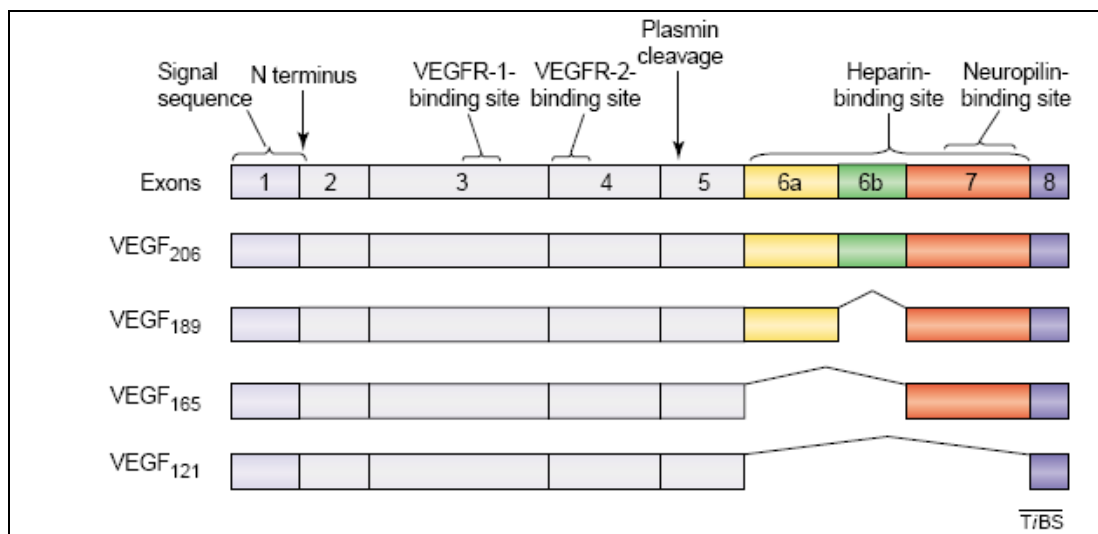


Figura 7. Isoformas de VEGF-A. O *splicing alternativo* de um único pré-mRNA produz ao menos quatro diferentes isoformas que variam no número total de aminoácidos (CROSS et al, 2003).

### 2.13 Receptores e co-receptores de VEGF

Os receptores de VEGF fazem parte da família de receptores tipo tirosino-quinase. Eles possuem sete domínios tipo imunoglobulina no domínio extracelular, uma única região transmembrana e uma seqüência tirosino-quinase consenso que é interrompida por um domínio de inserção-quinase, na porção intracelular (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; OLSSON et al, 2006; SHIBUYA, 2006). Eles possuem diferentes atividades tirosino-quinase em resposta ao ligante.

VEGFR-1, também denominado Flt-1 (Fms-tipo tirosino-quinase 1), foi o primeiro a ser identificado e é expresso em células endoteliais, monócitos/macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, pericitos e trofoblasto na placenta. O mRNA de Flt-1 pode passar pelo processo de *splicing alternativo* e gerar uma forma solúvel sVEGFR-1 que possui apenas o domínio extracelular. Essa forma solúvel pode inibir a ação de VEGF e está relacionada à pré-eclampsia (MAYNARD et al, 2003).

VEGFR-2 é conhecido também como KDR ou Flk-1 e é altamente expresso em células endoteliais e também em células tronco hematopoiéticas, osteoblastos, megacariócitos, células progenitoras da retina, entre outras (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Esse receptor é considerado o principal mediador dos efeitos fisiológicos e patológicos de VEGF nas células endoteliais (CROSS et al, 2003).

A região de ligação do VEGF aos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 está localizada dentro do segundo e terceiro domínios Ig (OLSSON et al, 2006).

VEGFR-3 possui característica distinta dos outros receptores. Em sua estrutura há uma substituição do quinto domínio tipo imunoglobulina, por uma ponte dissulfeto que mantém a parte N-terminal do domínio extracelular, clivado proteoliticamente, conectado com o resto da molécula. Esse receptor é expresso em células endoteliais linfáticas, capilares fenestrados, veias em órgãos endócrinos, monócitos e macrófagos (CROSS et al, 2003; OLSSON et al, 2006; TAMMELA et al, 2005).

As neuropilinas atuam como co-receptores na ligação dos VEGFs aos seus receptores. Essa pequena família de proteínas transmembrana tipo I inclui a neuropilina-1 e neuropilina-2. Elas foram inicialmente descobertas no sistema nervoso, onde elas funcionam como receptores para a família de semaforinas de classe III (HE; TESSIER-LAVIGNE, 1997). Quando são co-expressas em células com VEGFR-2 elas estabilizam a ligação de VEGF a esse receptor (CROSS et al, 2003; DVORAK, 2005; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; OLSSON et al, 2006). A neuropilina-1 é essencial para o desenvolvimento vascular enquanto a neuropilina-2 é requerida para o desenvolvimento de vasos linfáticos (KAWASAKI et al, 1999; YUAN et al, 2002).

## **2.14 VEGF e exercício**

Como já mencionado anteriormente, a formação de novos capilares sangüíneos é uma adaptação do músculo esquelético ao exercício e o VEGF tem um papel essencial na indução desse processo. Vários estudos têm mostrado a expressão de mRNA de VEGF e do conteúdo de proteína desse fator em resposta ao exercício no músculo esquelético de humanos e animais. Alguns desses autores acreditam que o modelo de expressão de VEGF depende do tipo de fibra, da intensidade e do tipo de exercício. Na literatura disponível foi encontrado que ambos os exercícios aeróbio e de força causam o aumento da expressão do mRNA de VEGF e do conteúdo da proteína desse fator (BIROT et al, 2003; GAVIN et al, 2007; GUSTAFSSON et al, 2005; JENSEN; BANGSBO; HELLSTEN, 2004; TRENERRY et al, 2007; WATERS et al, 2004).

Em um estudo onde foram utilizados camundongos com a expressão de VEGF reduzida, esses animais apresentaram a perda de dois terços da capilarização do músculo esquelético. A redução de 80-90% da expressão de VEGF no músculo desses animais induziu nitidamente um grande impacto no desempenho ao exercício. Os camundongos puderam

correr apenas 20% do tempo dos animais controle na mesma velocidade (WAGNER et al, 2006).

Dois estudos compararam a capilarização e a expressão de VEGF no músculo vasto lateral de jovens e idosos. Um deles foi realizado com mulheres e o outro com homens. Eles encontram que tanto a capilarização quanto a expressão de VEGF são mais baixas nos idosos do que nos jovens, antes e após o exercício aeróbico agudo. Eles acreditam que a baixa expressão de VEGF pode estar envolvida com a baixa capilarização encontrada nos indivíduos idosos (CROLEY et al, 2005; RYAN et al, 2006). Em ratos foi encontrado que o exercício atenuou a redução da capilaridade e ainda reverteu a diminuição da expressão do mRNA e da proteína de VEGF no coração induzida pela idade. Esse estudo mostrou também que os níveis de fosforilação da proteína de Akt e eNOS com o exercício foi modificado em associação com as alterações no nível da proteína de VEGF. Isso sugere que o treino modulou positivamente a sinalização angiogênica de VEGF diminuída com a idade no coração com mudanças na densidade capilar cardíaca (IEMITSU et al, 2006).

Um dos mais potentes estímulos para a expressão de VEGF é a hipóxia. Na presença de hipóxia há um aumento do fator induzível a hipóxia HIF- $\alpha$ , ambos mRNA e proteína, que estimula a transcrição do gene de VEGF. O papel da hipóxia está relacionado à angiogênese no músculo ativo onde a pO<sub>2</sub> (pressão parcial de oxigênio) pode ser baixa. Alguns experimentos relataram o aumento de HIF- $\alpha$ , tanto do mRNA quanto da proteína durante o exercício em humanos (BLOOR, 2005). Entretanto alguns trabalhos levaram a resultados equívocos nos quais o exercício em condições de hipóxia/isquemia não intensificou o aumento da expressão de VEGF, comparado com o exercício em condições de normóxia/hiperemia. Portanto a relação entre pO<sub>2</sub> dentro do músculo ativo e a resposta de mRNA de VEGF ainda não está bem estabelecida (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2006; RICHARDSON et al, 1999).

## **2.15 Angiogênese**

A angiogênese é o processo no qual, novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes. Ela ocorre em condições fisiológicas (embriogênese, ciclo menstrual, exercício, cicatrização de feridas) e patológicas (crescimento tumoral, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide). A formação de novos vasos pode ocorrer por dois mecanismos distintos, brotamento e intussuscepção (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; ROY;

BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

A angiogênese por brotamento se refere ao processo pelo qual as células endoteliais ativadas ramificam-se para fora do capilar existente, estendendo-se através da matriz extracelular para formar estruturas em forma de cordões. O cordão de células endoteliais é transformado em um tubo e atado a matriz extracelular. Esse processo requer a ativação das células endoteliais e a degradação da matriz ao redor do vaso. Esse processo é responsável pela formação de novos vasos sanguíneos em adultos (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Intussuscepção se refere ao processo pelo qual um único capilar se divide em dois pela formação de uma estrutura em forma de pilar ou pela divisão longitudinal do lúmen do capilar. As células endoteliais ativadas se estendem para dentro do lúmen formando dois tubos através dos quais o sangue pode passar. Esse processo requer menor proliferação das células endoteliais e oferece uma grande simplicidade no remodelamento da matriz. Esse processo é responsável pela formação dos vasos sanguíneos durante a embriogênese (DJONOV et al 2000; DJONOV; BAUM; BURRI, 2003; KURZ; BURRI; DJONOV, 2003).

Os primeiros passos no processo de angiogênese consistem na vasodilatação acompanhada por um aumento na permeabilidade do vaso e a degradação da matriz extracelular ao redor do mesmo, a qual permite que as células endoteliais ativadas e em proliferação, migrem formando estruturas em forma de cordões. Esses novos vasos são estabilizados pela matriz extracelular ao redor, sofrem um processo de maturação e precisam se reintegrar a rede vascular para que se tornem funcionais. As células endoteliais desses novos vasos devem adquirir fatores de sobrevivência que funcionem sob uma variedade de condições (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

A vasodilatação que ocorre nos primeiros passos da angiogênese se deve em grande parte em resposta ao óxido nítrico. O aumento na permeabilidade vascular é mediado por VEGF e é realizado por meio de da redistribuição de moléculas de adesão intracelular, incluindo a molécula de adesão de célula endotelial à plaqueta (PECAM)-1 e a caderina endotelial vascular, (VE)-caderina, e alterações na estrutura da membrana celular via indução de uma série de quinases. O extravazamento das proteínas do plasma, também induzido pelo VEGF, é requerido para criar uma estrutura de suporte temporário para a subsequente migração das células endoteliais ativadas (CARMELIET, 2000; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

A degradação da matriz extracelular é essencial para a formação dos novos vasos sanguíneos. Ela envolve uma série de proteases as quais provêm não apenas o espaço

para a migração das células endoteliais, mas também resultam na liberação de fatores de crescimento, incluindo bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico), VEGF e o fator de crescimento tipo-insulina-1 (IGF-1) (BLOOR, 2005; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004). A proteólise da matriz é realizada por várias famílias de enzimas, entre elas as matriz metaloproteases (MMPs), plasminogênio e os ativadores de plasminogênio de tecido e tipo uroquinase (tPA e uPA) (BLOOR, 2005; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Uma vez degradada a matriz as células endoteliais podem agora se proliferar e migrar livremente. Nesse passo vários fatores de crescimento agem conjuntamente, entre eles estão o VEGF, FGFs, PDGF e angiopoietinas (Ang1 e Ang2). O papel de VEGF na indução da angiogênese já foi descrito anteriormente. Ang1 via fosforilação do receptor Tie2 induz a proliferação de células endoteliais e estimula a interação dessas células com as células periendothelias. Ang2 junto com VEGF é também angiogênica, porém na ausência de VEGF ela pode induzir a regressão dos vasos (CARMELIET, 2000; BLOOR, 2005; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Após a migração das células endoteliais através da matriz extracelular, elas reúnem-se em cordões sólidos, e subseqüentemente, adquirem um lúmen. O diâmetro do lúmen é fortemente regulado por vários fatores. Enquanto VEGF<sub>121</sub> e VEGF<sub>165</sub> quando ligados aos seus receptores aumentam a formação do lúmen, VEGF<sub>189</sub> diminui o diâmetro do mesmo. Ang1 junto com VEGF também aumenta o diâmetro do lúmen (CARMELIET, 2000; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

Uma vez reunidas em novos vasos, as células endoteliais se tornam quiescentes e sobrevivem por muitos anos. VEGF é uma das moléculas responsáveis pela sobrevivência das células endoteliais. Essa função do VEGF depende da interação entre VEGFR-2,  $\beta$ -catenina e (VE)-caderina. Ang1 também promove, enquanto Ang2 suprime a sobrevivência das células endoteliais (CARMELIET, 2000; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

Com o amadurecimento da rede vascular, as solicitações fisiológicas locais devem ser fornecidas. Para esse fim, as células endoteliais adquirem características altamente especializadas para prover as necessidades funcionais dentro dos tecidos e órgãos específicos. Por exemplo, as células endoteliais nas glândulas endócrinas, envolvidas nas trocas de partículas, se tornam descontínuas e fenestradas. Isso é possivelmente mediado pela interação entre VEGF e a matriz extracelular (CARMELIET, 2000; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

O estabelecimento da rede funcional ainda requer que os vasos nascentes



desenvolvam-se em vasos duráveis. A associação de pericitos e células musculares lisas com os novos vasos formados regula a proliferação, migração, sobrevivência, diferenciação das células endoteliais, além da ramificação vascular, fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)-BB e seu receptor, PDGFR- $\beta$ , tem papéis essenciais na estabilização dos vasos sanguíneos nascentes pelo recrutamento de células progenitoras mesenquimais. Ang1 também é crítica para a formação e estabilização dos vasos. Ela estabiliza os vasos nascentes facilitando a comunicação entre as células endoteliais e os pericitos. TGF-  $\beta$ 1 promove a maturação dos vasos estimulando a produção da matriz extracelular e induzindo a diferenciação das células do mesênquima em pericitos (CARMELIET, 2003; JAIN, 2003).

### **3 OBJETIVO**

Uma vez que não há relatos na literatura do efeito dos esteróides anabólicos androgênicos na expressão de VEGF no músculo esquelético em associação com o exercício de carga, o objetivo desse trabalho foi analisar a expressão de VEGF no músculo sóleo de ratos com a administração suprafisiológica de Decanoato de Nandrolona, associando ao exercício de carga na água.

#### **4 HIPÓTESE**

Uma vez que estudos prévios já relataram o aumento na expressão do mRNA de VEGF com o exercício de força e que nosso grupo, em estudos prévios, encontrou uma diminuição na atividade da MMP-2 no músculo esquelético, com o exercício e a administração de EAA utilizando o mesmo protocolo e sabendo que essa protease é um fator importante no processo de angiogênese e na indução da secreção de fatores angiogênicos como o VEGF, nós atribuímos a seguintes hipóteses:

- ❖ Hipótese 1: o exercício de carga realizado na água promoverá o aumento do mRNA de VEGF no músculo sóleo dos animais.
  
- ❖ Hipótese 2: a associação do exercício de carga com a administração do decanoato de nandrolona irá inibir a expressão do mRNA de VEGF no músculo sóleo dos animais.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Animais**

Foram utilizados neste trabalho 24 ratos machos, Wistar, com peso em torno de 180 g provenientes do Biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os ratos foram colocados em gaiolas coletivas (seis animais em cada) e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício desta universidade em temperatura ambiente entre 22 e 24°C com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro-escuro). A água e a comida foram administradas *ad libitum*.

O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (National Research Council, 1996). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, processo nº. 002/2006, parecer 004/2006.

### **5.2 Desenho experimental**

O desenho experimental e o protocolo de treinamento para os animais foram descrito por Marqueti et al. (2008). Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, sendo eles: sedentário controle (S), sedentário com anabolizante (EAA) treinado controle (T) e treinado com anabolizante (EAAT).

#### **5.2.1 Grupo Sedentário**

Neste grupo os animais permaneceram nas suas gaiolas, sem qualquer atividade física, durante o período de sete semanas de duração do protocolo para os animais treinados.

#### **5.2.2 Grupo treinado**

Os animais desse grupo foram submetidos a um programa específico de saltos

em um tubo PVC de 25 cm de diâmetro, contendo uma quantidade de água equivalente ao dobro do comprimento do corpo do animal, com o objetivo de limitar a alternativa do animal em ir para outra direção ou agarrar-se para subir.

A temperatura da água foi mantida em aproximadamente 32°C por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal do rato. Foram realizadas cinco sessões de treinamento semanais, durante um período de sete semanas. O treino era realizado aproximadamente no mesmo horário sempre ao entardecer.

### **5.3 Tratamento com EAA**

Os animais tratados receberam administração da droga Deca-Durabolin® (decanoato de nandrolona, Organon, 50 mg/ml). As doses foram da ordem de 5 mg/kg de massa corporal do rato (dose suprafisiológica). A administração do anabolizante foi realizada duas vezes na semana. A aplicação foi feita via subcutânea no dorso dos animais.

Os grupos controles receberam uma injeção de veículo composta de uma solução contendo óleo de amendoim (1ml) e álcool benzílico (50µl) que é o mesmo veículo dos EAA administrados. A dose do veículo aplicada estava de acordo com os mesmos critérios dos animais que receberam o EAA.

O tratamento teve início na primeira semana de treinamento, propriamente dito, totalizando sete semanas de tratamento.

### **5.4 Protocolo de treinamento**

O treinamento constituiu de saltos na água, sendo ajustada uma sobrecarga de acordo com o peso do animal. O protocolo está de acordo com o modelo de Silva; Marcondes; Mello (1999), modificado por Marqueti et al. (2003).

A sobrecarga foi acoplada ao tórax dos animais através de um colete especial que permitiu a execução dos saltos sem que a carga escorregasse dos corpos dos mesmos.

Uma sobrecarga a mais correspondente ao peso do colete quando molhado (20 g), foi considerada e debitada da carga específica correspondente à massa corporal do animal para uma melhor precisão do treinamento.

A atividade de treino foi desenvolvida, como já citado, num período de sete semanas descritas a seguir:

- semana pré-treinamento (semana de adaptação dos animais ao exercício, neste período não foi feita administração de EAA): foi utilizada uma sobrecarga equivalente a 50% do peso do animal, com um número de séries ajustadas de duas para quatro repetições ajustadas de cinco para dez saltos, com um intervalo de repouso entre as séries de 30 segundos. A

- 1ª semana: início do treino com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal do animal. Foram realizadas 4 séries de 10 saltos, com intervalo de repouso de 30s entre as séries.

Da 2ª a 7ª foram realizadas as mesmas quatro séries de 10 saltos com intervalo de 30s entre as séries, aumentando a sobrecarga em 5% por semana.

- 2ª semana: sobrecarga de 55% do peso corporal do animal.

- 3ª semana: sobrecarga de 60% do peso corporal do animal.

- 4ª semana: sobrecarga de 65% do peso corporal do animal.

- 5ª semana: sobrecarga de 70% do peso corporal do animal.

- 6ª semana: sobrecarga de 75% do peso corporal do animal.

- 7ª semana: sobrecarga de 80% do peso corporal do animal.

Todos os foram pesados às 2ª, 4ª e 6ª – feiras, para que o protocolo de treinamento possa ser desenvolvido.

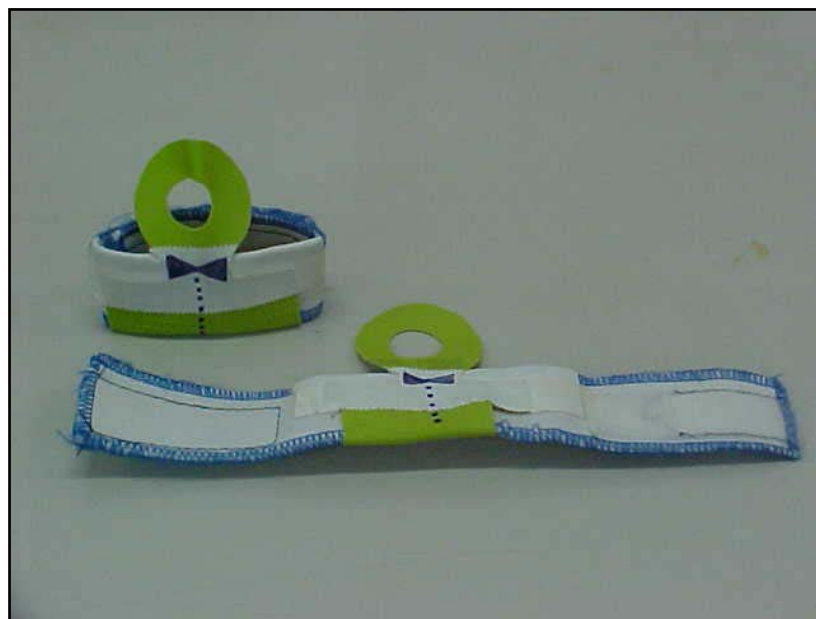


Figura 8. Colete confeccionado para o acoplamento das cargas na realização do protocolo experimental. O elástico verde era passado no pescoço do animal e o fechamento do colete se dava no dorso.



Figura 9. Um dos animais durante o intervalo entre as séries. O animal ficava descansando em uma grade durante os 30 segundos de cada intervalo entre as séries e a mesma era utilizada para auxiliar na retirada do animal da água após os 10 saltos.

### **5.5 Sacrifício dos animais e retirada do músculo sóleo.**

Imediatamente após o término do período experimental, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina. Os animais foram posicionados então em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal para a retirada do músculo sóleo. Os músculos foram pesados úmidos, colocados em eppendorfs, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

### **5.6 Extração de RNA total.**

Dos músculos retirados dos animais foram extraídas amostras de 100 mg e adicionado 1 mL de Reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA) sendo então homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador Power Gen1000 (Fisher Scientific). O RNA total foi isolado conforme as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria com leitura em 260 nm. Todas as soluções foram preparadas com água tratada com 0,01% DEPC (Dietilpirocarbonato) (livre de RNase). Todos os materiais

utilizados na extração foram tratados com peróxido de hidrogênio 0,1% e em seguida com água livre de RNase.

A integridade do RNA foi verificada pelo corante brometo de etídeo em gel de agarose-formaldeído 1%, utilizando tampão MOPS (Ácido 3-N Morfolino Propanosulfônico) (MASEK et al, 2005).

### 5.7 Síntese de cDNA e PCR semiquantitativo

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA transcrito reversamente pela enzima M-MLV (Promega, Madison, WI). A reação consistiu de uma primeira etapa onde foram adicionadas, em microtubos, as amostras de RNA (1 µg), 0,5 µl de primer poli-T (1 µg/µl) em um volume total  $\leq 7,5$  de água livre de RNase. Esses eppendorfs foram levados ao banho seco por 5 min a 70°C e resfriados imediatamente. Em seguida foi feita uma mistura contendo 2,5 µl do tampão da enzima (M-MLV 5X Reaction Buffer), 0,625 µl de cada dNTP (10 mM) e 0,5 µl da enzima M-MLV transcriptase reversa. Esses volumes foram multiplicados pela quantidade de amostras. A mistura de volume 5,5 µl foi então adicionada aos microtubos e levadas ao banho seco a 37°C por uma hora. O cDNA foi estocado à -20°C.

Para analisar o sucesso da síntese de cDNA foi realizado o experimento de PCR obtendo apenas a amplificação qualitativa do gene de VEGF e GAPDH. Os ciclos consistiram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, para ambos os genes, com a utilização de *primers* específicos. Os resultados obtidos foram resolvidos em gel de agarose 1%.

Nesse trabalho foi utilizada nas análises a isoforma 165 de VEGF-A, para não repetirmos o termo VEGF-A<sub>165</sub> no restante do trabalho nos referiremos a ela apenas por VEGF.

### 5.8 PCR quantitativo

Os níveis de mRNA de VEGF foram quantificados utilizando o reagente SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Fosters City, CA). Foi utilizado para a reação 1µl do cDNA produzido, 2 µl de cada primer (Foward e Reverse), 25µl do reagente contendo corante SYBR Green, Taq DNA polimerase, dNTPs (com dUTP), tampão, e



completado com 24µl de água autoclavada para um volume final de 52µl, dividido em dois tubos (duplicata) cada um com 25µl.

A reação foi efetuada no termociclador Rotor Gene RG3000 (Corbett Research) e os ciclos consistiram de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Os primers de VEGF utilizados foram forward 5'-TGCACCCACGACAGAAGG-3' e reverse 5'-GCACACAGGACGGCTTGA-3', formando um amplicon de 154 pares de base (ASANO *et al.*, 2007). Os primers de VEGF amplificaram a isoforma de VEGF e foram cedidos pelo laboratório de Neurociências, Unidade de Plasticidade Muscular, do departamento de Fisioterapia da UFSCar. Os primers de GAPDH (Gliceraldeído fosfato desidrogenase) foram utilizados como controle endógeno, consistindo de um *forward* 5'-GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG-3' e um *reverse* 5'-GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA-3' (GeneBank: AF106860) formando um amplicon de 196 pares de base (JEMIOLO; TRAPPE, 2004). As seqüências dos primers de GAPDH foram fornecidas também pelo laboratório de Neurociências, Unidade de Plasticidade Muscular. Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de *melting*. O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método DDcT. Os valores de Ct (*Threshold Cycle*) e as curvas de *melting* foram fornecidos pelo *software* Rotor Gene – 6. O Ct se refere ao ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com significância no menor número de ciclos. Ele ocorrerá sempre na fase exponencial da amplificação (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

## 5.9 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Os níveis de expressão de mRNA de VEGF foram normalizados pelos níveis de mRNA para GAPDH. Todos os valores apresentaram distribuição normal e por isso foi utilizado o teste Anova one-way. Quando a diferença apresentada foi significativa o teste Tukey foi aplicado para múltiplas comparações. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico 5% ( $p \leq 0,05$ ). O *software* de estatística utilizado foi o Statistica® 6.1.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Peso dos animais

Entre os grupos experimentais não houve diferença significativa do peso corporal, como mostrado na tabela 1. Os valores correspondem à última pesagem antes do sacrifício dos animais.

Tabela 1. Variação do peso corporal final entre os diferentes grupos.

Grupos Experimentais*				
Peso corporal (g)	S (média ± EP)	T (média ± EP)	EAA (média ± EP)	EAAT (média ± EP)
	349 ± 12,245	348 ± 12,698	380 ± 16,388	306 ± 17,368

\*Os valores são mostrados como média ± erro padrão da média,  $p > 0,05$

### 6.2 Peso dos músculos

Na tabela 2 observa-se que não houve diferença significativa no peso dos músculos entre os grupos após o experimento.

Tabela 2. Variação do peso muscular normalizada pelo peso corporal final entre os diferentes grupos.

Grupos Experimentais*				
Peso muscular/peso corporal	S (média ± EP)	T (média ± EP)	EAA (média ± EP)	EAAT (média ± EP)
Sóleo	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,3	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2

\*Os valores são mostrados como média x  $10^{-4}$  ± erro padrão da média x  $10^{-4}$ ,  $p > 0,05$

### 6.3 Extração de RNA total

Na figura 10 observa-se a integridade do RNA extraído, foi possível verificar as bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S e 18S. A figura também mostra que não

houve contaminação da amostra com DNA genômico.

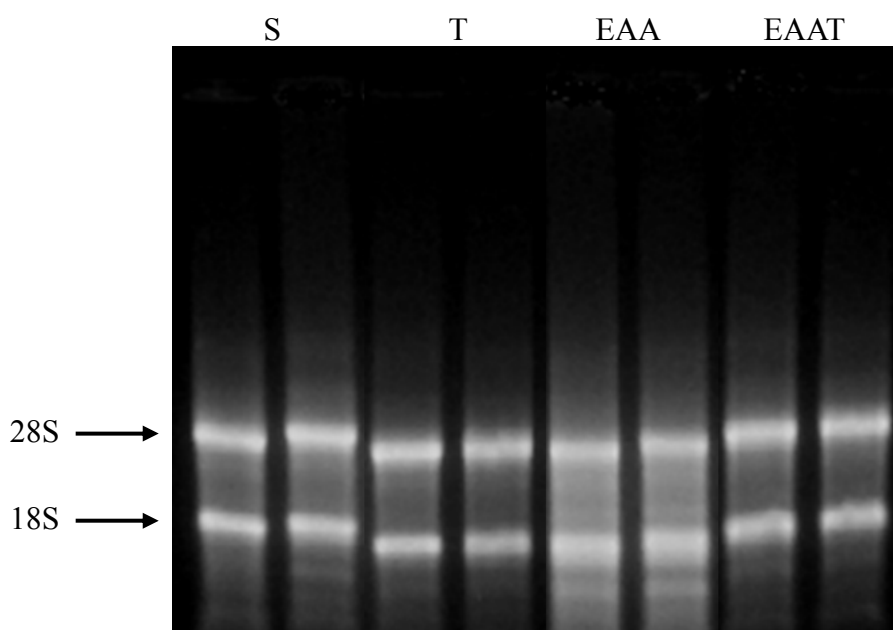


Figura 10. RNA total extraído do músculo sóleo esquerdo de dois animais de cada grupo, resolvido em gel de agarose-formaldeído 1%. Grupos sedentário (S), treinado (T), sedentário com administração de decanoato de nandrolona (EAA) e treinado com administração da mesma droga (EAAT).

#### 6.4 Síntese de cDNA e PCR semiquantitativo

A partir do RNA foi produzido o cDNA, uma molécula mais estável facilitando a manipulação nos experimentos seguintes. Com o cDNA foi realizado o experimento de PCR obtendo apenas a amplificação qualitativa do gene de interesse, o gene de VEGF, pela utilização de *primers* específico. Foi realizada da mesma forma a PCR com o gene controle, GAPDH. Os resultados obtidos da PCR foram resolvidos em gel de agarose 1% e estão apresentados nas figuras 11 e 12.

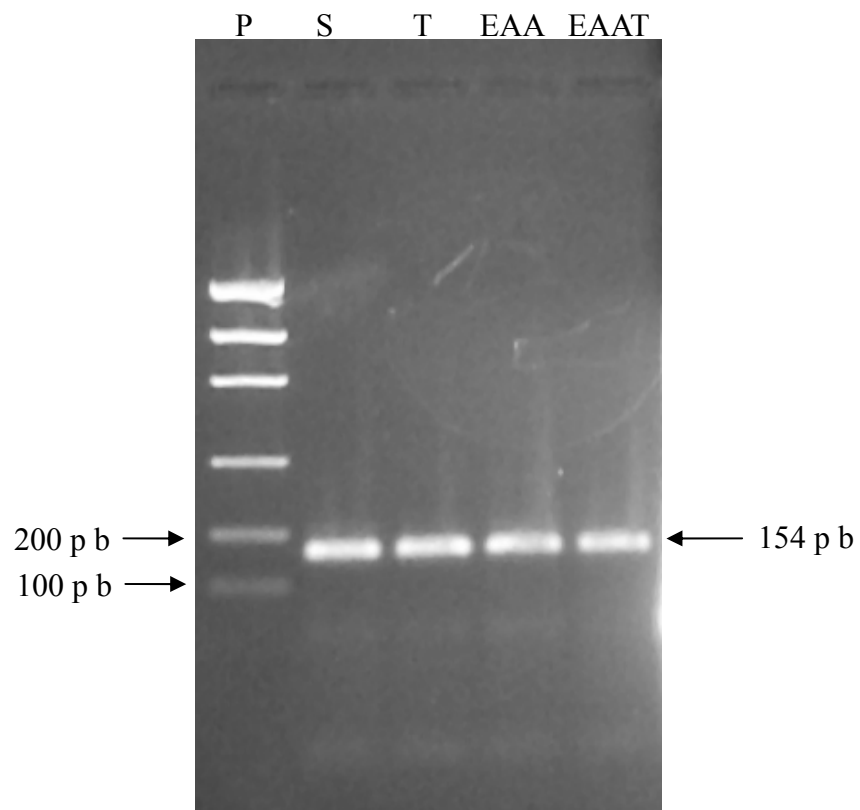


Figura 11. Perfil eletroforético de cDNA de VEGF produzido a partir de RNA total extraído do músculo sóleo. Sendo P = padrão, S = sedentário, T = treinado, EAA = sedentário com administração de EAA e EAAT = treinado com administração de EAA. As bandas possuem 154 pares de bases.

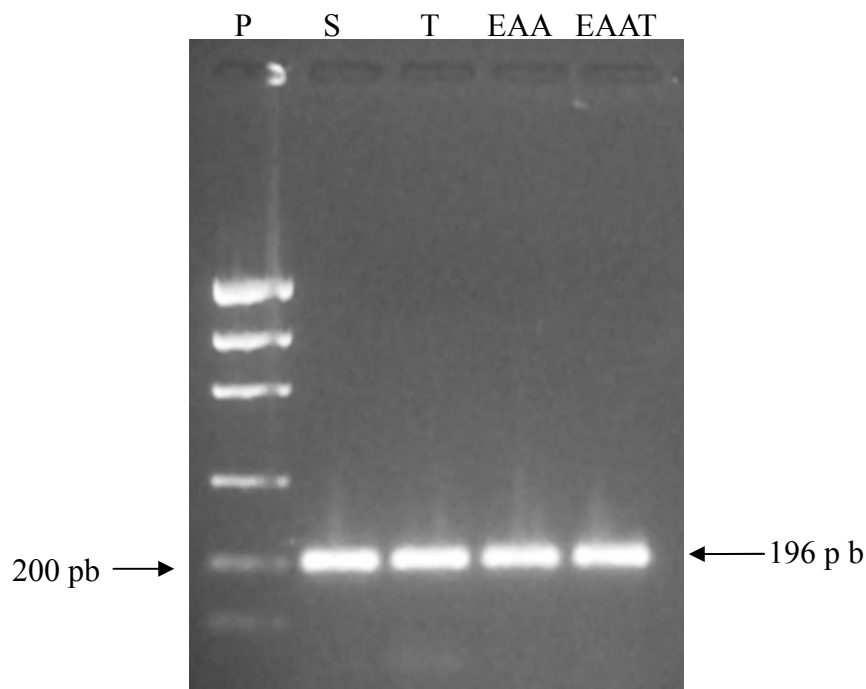


Figura 12. Perfil eletroforético de cDNA de GAPDH produzido a partir de RNA total extraído do músculo sóleo. P = padrão, S = sedentário, T = treinado, EAA = sedentário com administração de EAA e EAAT = treinado com administração de EAA. As bandas possuem 196 pares de bases.

### 6.5 PCR em tempo real

Com os *primers* testados em PCR semiquantitativo, foi realizado então o PCR em tempo real, para a quantificação da expressão do mRNA de VEGF. Nesse experimento foram obtidos os valores de Ct em duplicata e foi calculada a média desses valores para cada indivíduo, como mostrado na tabela 3. A tabela traz também as médias dos Cts da expressão do gene normalizador GAPDH. Em seguida são mostrados na tabela os valores calculados para se chegar aos valores de expressão de cada indivíduo representados em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 3. Cálculo da expressão do mRNA de VEGF obtido pela PCR em tempo real.

Grupo	GAPDH Média Cts	VEGF Média Cts	$\Delta$ Ct	Média S	$\Delta\Delta$ Ct	UA	UA (média $\pm$ EP)
Sedentário	12,90	17,56	5,37	6,68	- 1,43	2,71	1,55 $\pm$ 0,42
	12,05	17,20	5,15		- 1,65	3,14	
	12,44	22,87	10,4		3,63	0,08	
	13,80	19,45	6,07		- 0,73	1,66	
	12,29	19,29	7,00		0,19	0,87	
	13,83	19,92	6,09		- 0,59	1,51	
Treinado	11,81	16,90	5,09	4,72	- 1,71	3,28	4,34 $\pm$ 0,52
	11,62	15,86	4,24		- 2,56	5,91	
	12,03	16,62	4,59		- 2,21	4,64	
	11,61	16,04	4,43		- 2,37	5,18	
	11,69	16,95	5,26		- 1,54	2,91	
	13,16	17,29	4,13		- 2,55	5,87	
EAA	12,60	18,45	5,85	6,57	- 0,95	1,93	1,58 $\pm$ 0,41
	14,73	21,24	6,51		- 0,29	1,22	
	13,40	21,51	8,11		1,30	0,40	
	11,43	16,83	5,40		- 1,40	2,64	
	20,71	27,70	6,99		0,18	0,08	
	11,44	16,53	5,09		- 1,59	3,02	
EAAT	12,45	17,48	5,03	5,69	-1,59	0,81	0,50 $\pm$ 0,11
	11,08	17,99	6,91		-2,44	0,22	
	11,75	17,53	5,78		-2,09	0,48	
	10,43	16,15	5,72		-2,25	0,50	
	11,80	16,83	5,03		-1,42	0,81	
	12,70	19,87	7,17		-2,55	0,18	

O Ct de VEGF e GAPDH foi obtido da média do Ct das duplicatas/amostra. O  $\Delta$ Ct, ou delta Ct, é o valor do Ct de VEGF menos o valor do Ct de GAPDH. A média S é a média dos valores de  $\Delta$ Ct. O  $\Delta\Delta$ Ct (delta delta Ct) é o valor de  $\Delta$ Ct menos a média S, o  $\Delta\Delta$ Ct dos grupos S, T e EAA foi calculado em relação ao grupo sedentário e o  $\Delta\Delta$ Ct do grupo EAAT foi calculado em relação ao grupo treinado que é o controle para esse grupo. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão de VEGF para cada indivíduo é calculado por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Com os valores em UA foram realizados testes estatísticos utilizando o software Statistica® 6.1. As figuras 13 e 14 contêm a representação gráfica dos valores da expressão de VEGF em UA.

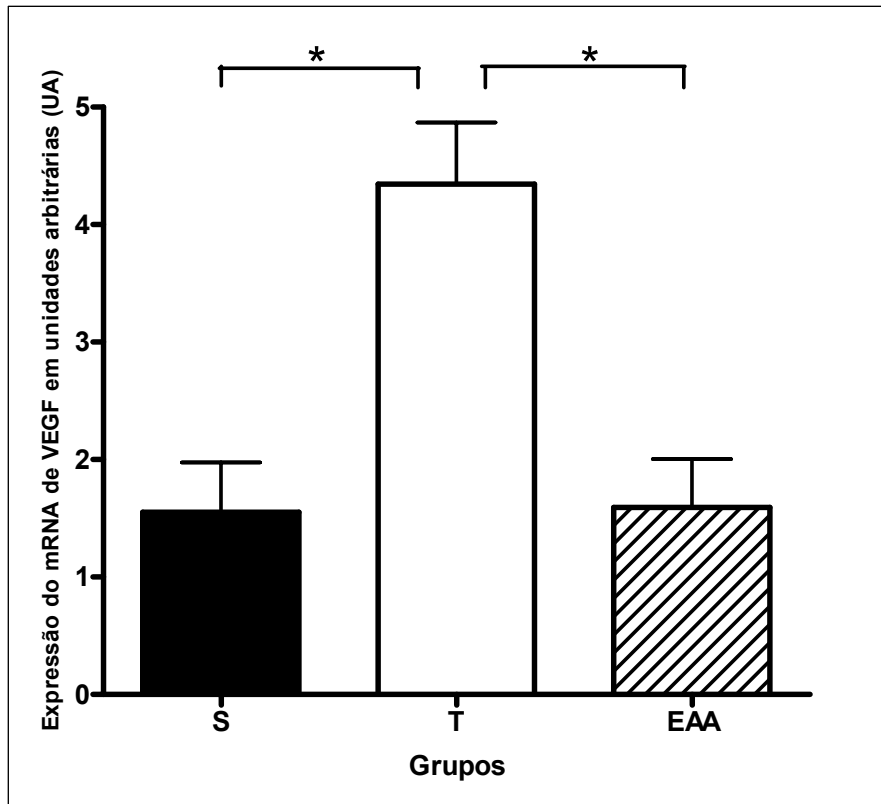


Figura 13. Representação gráfica da expressão de VEGF em unidades arbitrárias (UA). S (sedentário), T (treinado), EAA (sedentário com administração de EAA). Os valores com significância estatística foram atribuídos para  $p < 0,05$ , sendo  $*p < 0,01$ .

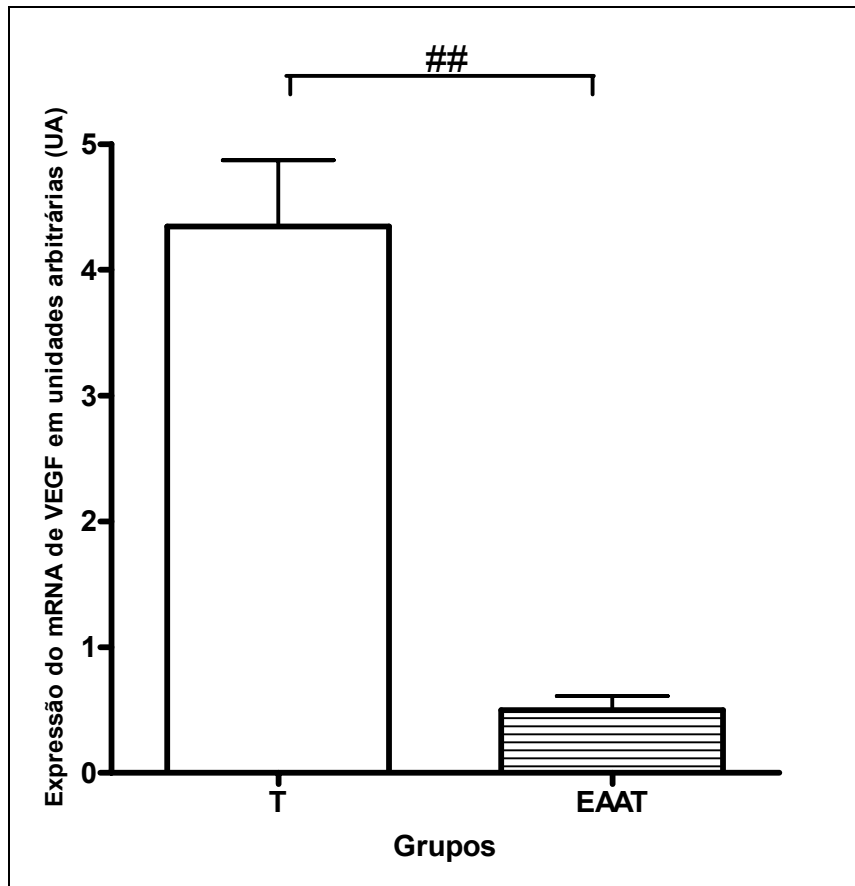


Figura 14. Representação gráfica da expressão de VEGF em unidades arbitrárias (UA). Sendo T (treinado), EAAT (treinado com administração de EAA). Os valores com significância estatística foram atribuídos para  $^{##}p < 0,0001$  (muito significante).

Pelas análises estatísticas foi possível observar que o grupo treinado teve a expressão de VEGF aumentada em relação aos grupos que não treinaram (S e EAA). Foi também observada a inibição na expressão de VEGF nos animais que treinaram e receberam administração de EAA em relação aos animais que treinaram e receberam o veículo.



## 7 DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos que envolvem o músculo esquelético e a administração de EAA tem analisado o efeito dessas substâncias na força e no tamanho do músculo. Os efeitos adversos estudados dos EAA no músculo estão em grande parte limitados aos danos no tendão. Vários estudos têm relatado a ruptura de tendões devido à grande força gerada pelo músculo, em resposta às substâncias anabólicas, que não é acompanhada pelo tecido inelástico característico do tendão. Entretanto, há poucos estudos mostrando os efeitos adversos intramusculares dessas drogas quando associadas ao exercício.

O protocolo de treinamento empregado nesse trabalho juntamente com a administração de EAA não parece ter desencadeado processo hipertrófico no músculo estudado. Não houve aumento no peso dos músculos em relação ao peso corporal. Entretanto outras análises para se determinar esse parâmetro são necessárias. Apesar desse protocolo favorecer as adaptações para hipertrofia, sabe-se que o músculo sóleo possui predominância de fibras oxidativas, e devido à especificidade muscular diante do treinamento empregado, o padrão de recrutamento desse músculo frente ao exercício pode não ter sido eficaz para desencadear a hipertrofia (CUNHA et al, 2006).

A expressão de VEGF no músculo esquelético em resposta ao exercício tem sido muito estudada recentemente. O aumento da expressão do mRNA de VEGF, mostrado nesse trabalho, no músculo sóleo de ratos submetidos ao treino de salto na água está de acordo com o encontrado na literatura. Gavin e Wagner (2001) relataram o aumento na expressão do mRNA de VEGF no músculo gastrocnêmio de ratos após uma sessão de treino em esteira. Esse aumento foi maior quando o exercício foi realizado numa intensidade de 50% do  $VO_2$  máximo. Gavin et al. (2004) mostraram que apenas uma sessão de treino foi suficiente para aumentar a expressão do mRNA de VEGF e que o conteúdo protéico de VEGF diminuiu imediatamente após o exercício no músculo vasto lateral de homens sedentários. Eles acreditam que a proteína seria secretada para o meio intersticial e entraria subsequente na corrente sanguínea, ou ainda que essa proteína poderia ser clivada proteoliticamente dos seus sítios de ligação extracelular. Outro trabalho realizado com animais mostrou que a expressão do mRNA de VEGF em fibras musculares do tipo IIB foi duas vezes maior do que em outros tipos de fibras. Nesse estudo os ratos foram submetidos a uma única sessão de treino em esteira por 90 minutos a uma intensidade maior que 50% do  $VO_2$  máximo. Isso poderia indicar uma especificidade da expressão do gene de VEGF ao tipo

de fibra, durante o exercício (BIROT et al, 2001). Inversamente, Gustafsson et al. (2005) não encontraram diferença na expressão das isoformas de VEGF nos diferentes tipos de fibra.

Gavin et al. (2007) encontraram um aumento na expressão do mRNA de VEGF e de seus receptores, além do aumento no conteúdo da proteína de VEGF no músculo vasto lateral de humanos com o exercício agudo de força. Nesse estudo os indivíduos realizaram três séries de 10 repetições a 60-80% de 1 RM (repetição máxima) na cadeira extensora com dois minutos de descanso entre as séries. Outro estudo também encontrou o aumento na expressão do mRNA de VEGF utilizando um protocolo de força onde os indivíduos realizaram três séries de 12 repetições de extensão do joelho, com dois minutos de intervalo entre as séries (TRENERRY et al, 2007).

Os autores Gustafsson et al. (2005) encontram maior expressão do mRNA de VEGF-A<sub>165</sub> no músculo de humanos em resposta ao exercício submáximo. Essa isoforma foi utilizada no nosso trabalho e é descrita em outros trabalhos como a mais encontrada em diferentes tipos de tecido na indução da angiogênese. Outras isoformas também são expressas como o VEGF-A<sub>121</sub> e VEGF-A<sub>189</sub> após o exercício, porém em menor quantidade. Gustafsson et al (2005) acreditam que a expressão dessas isoformas se dá de forma temporal. Eles analisaram a expressão das isoformas VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>121</sub> e VEGF-A<sub>189</sub> duas e seis horas após duas sessões de exercício em cicloergômetro, de intensidade submáxima. O mRNA de VEGF-A<sub>165</sub> aumentou significativamente duas horas depois, mas diminuiu em seis horas após o término do exercício. A isoforma 121 também aumentou em duas horas e diminuiu em seis horas após as sessões, mas em quantidade inferior a da 165. Já a isoforma 189 mostrou um aumento maior após seis horas de terminado o exercício (GUSTAFSSON et al, 2005).

Como já descrito anteriormente nesse trabalho, as isoformas de VEGF-A diferem pela presença ou ausência de alguns éxons que determinam a capacidade de ligação dessas moléculas a heparana sulfato da matriz extracelular. As isoformas que não possuem o éxon 6 que codifica a ligação a heparana sulfato são mais difusíveis (VEGF-A<sub>121</sub> e VEGF-A<sub>165</sub>). VEGF-A<sub>121</sub> ainda não possui o éxon 7 de ligação às neuropilinas na membrana; dessa forma, acredita-se que ela seja mais rapidamente metabolizada ou lançada na corrente sanguínea. VEGF-A<sub>165</sub> se liga às neuropilinas e essas agem como co-receptores auxiliando na ligação do VEGF ao receptor realçando sua atividade. A isoforma 189 se liga fortemente à heparana sulfato ficando seqüestrada na matriz sendo necessária a clivagem dessa molécula para que ocorra sua interação com o receptor (GUSTAFSSON et al, 2005; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

Nesse trabalho nós relatamos, pela primeira vez, o efeito do EAA na expressão

de VEGF no músculo esquelético associado ao exercício. Foi demonstrado que a administração de EAA durante sete semanas junto com o treinamento causou a inibição da expressão do mRNA de VEGF no músculo sóleo dos animais, confirmando a hipótese 2 atribuída antes da realização dos experimentos.

Recentemente foi demonstrado que a exposição de HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana), que são as principais células constituintes da vasculatura, ao EAA alterou o crescimento dessas células com um forte efeito antiproliferativo e induziu a apoptose. Esses pesquisadores sugerem que essas alterações encontradas poderiam ser consideradas como efeitos que predisõem sérios danos ao nível celular dos vasos o que pode afetar não apenas os novos vasos em formação, mas também os vasos pré-existentes (D'ASCENZO et al, 2007).

Um estudo recente publicado por nosso laboratório, utilizando o mesmo protocolo de treinamento, relatou um aumento na atividade da MMP-2 nos músculos sóleo e gastrocnêmio dos ratos que treinaram em comparação com o grupo sedentário. Entretanto, quando o treino foi associado à administração de decanoato de nandrolona houve uma diminuição importante na atividade dessa mesma proteína (MARQUETI et al, 2008). As MMPs são importantes para o remodelamento do músculo na adaptação ao exercício, incluindo o processo de angiogênese. Além da função essencial de degradar a matriz extracelular promovendo o espaço para a formação dos novos vasos, elas induzem a liberação de uma série de fatores de crescimento pró-angiogênicos incluindo o VEGF. A MMP-2 parece ser uma das mais importantes MMPs associadas à angiogênese induzida pela atividade física, no músculo esquelético (CARMELI et al, 2004). Rivilis et al. (2002) observaram que o aumento na MMP-2 no músculo quando este foi submetido a uma sobrecarga foi acompanhado por um aumento na capilaridade e na expressão de VEGF. Haas et al. (2000) relataram que a estimulação crônica dos músculos da pata posterior de ratos induziu uma potente resposta angiogênica que foi detectada por um aumento na razão capilar/fibra. Eles observaram também que essa resposta foi aliada ao aumento na produção de MMP-2 (HAAS et al, 2000).

Apesar de o VEGF ser uma molécula importante na indução da angiogênese, outros fatores de crescimento estão também relacionados com esse processo tais como FGF-1 (*fibroblast growth factor-1*) (PRESTA et al, 2005), TGF- $\alpha$  e  $\beta$  (*transforming growth factor  $\alpha$  e  $\beta$* ), PGDF (*platelet-derived growth factor*) e outros (Werner e Grose, 2003). Dessa forma não podemos afirmar que a diminuição da expressão de VEGF com a administração de EAA nesse trabalho foi acompanhada de uma redução do número de capilares no músculo,

pois não foram realizados experimentos que permitissem tal conclusão como por exemplo, a contagem de vasos por análises histológicas e a detecção de outros fatores angiogênicos por PCR em tempo real ou Western Blotting.

Foi feito o Western Blotting para VEGF, mas as bandas encontradas não correspondiam com o tamanho esperado para a proteína. O anticorpo utilizado foi sintetizado para o VEGF de humano e talvez por isso não tenha sido específico. Como a quantidade de amostra era limitada não foi possível repetir o experimento com outros anticorpos.

## 8 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- ❖ O treinamento de salto com carga na água promove aumento na expressão do mRNA de VEGF.
- ❖ O treinamento de salto com carga na água quando combinado com a administração de decanoato de nandrolona, um esteróide anabólico androgênico, inibe a expressão do mRNA de VEGF.
- ❖ As hipóteses atribuídas antes da realização dos experimentos foram confirmadas.

## 9 REFERÊNCIAS

ACADEMIC KELLOGG. Disponível em <[http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201\\_McKinley/f101a\\_structural\\_organ\\_c.jpg](http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/f101a_structural_organ_c.jpg)>. Acesso em: 12 maio de 2008.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4.ed. New York: Garland Science, 2002.  
ALÉN, M. Androgenic steroids effects on liver and red cells. **British Journal of Sports Medicine**, v. 19, n. 1, p. 15 – 20, 1985.

ASANO, T. et al. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. **Circulation Journal**, v. 71, p. 405 – 411, 2007.\

BAHRKE, M. S.; YESALIS, C. E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 614 – 620, 2004.

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p. 345 – 357, 2001.

BERNSTEIN, A.; SAFIRSTEIN, J.; ROSEN, J. E. Athletic ergogenic aids. **Hospital for Joint Diseases**, v. 61, n. 3/4, p. 164 – 171, 2003-2004.

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

BHASIN, S.; BREMNER, W. J. Emerging issues in androgen replacement therapy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 1, p. 3 – 8, 1997.

BHASIN, S. et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. **American Journal of Pshysiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 281, p. E1172 – E1181, 2001.

BIROT, O. J. G. et al. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. **Journal of Physiology**, v. 552, p. 213 – 221, 2003.

BLOOR, C. M. Angiogenesis during exercise and training. **Angiogenesis**, v. 8, p. 263 – 271,

2005.

CALFEE, R.; FADALE, P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. **Pediatrics**, v. 117, p. e577 – e589, 2006.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 389 – 395, 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653 – 660, 2003.

CARMELI, E. et al. Matrix Metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v. 29, p. 191 – 197, 2004.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 601 – 615, 2006.

CHOI, P. Y. L.; POPE JR, H. G.; OLIVARDIA, R. Muscle dysmorphia: a new syndrome in weightlifters. **British Journal of Sports Medicine**, v. 36, p. 375 – 377, 2002.

CHUNG, B. Muscle dysmorphia. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 44, n. 4, p. 565 – 574, 2001.

CONWAY, E. M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 507 – 521, 2001.

CROLEY, A. N. et al. Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. women. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, p. 1872 – 1879, 2005.

CROSS, M. J. et al. VEGF-receptor signal transduction. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 9, p. 488 – 494, 2003.

CUNHA, T. S. et al. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 165 – 179, 2004.

CUNHA, T. S. et al. Influence of high-intensity training and anabolic steroids treatment on rat

tissue glycogen content. **Life Sciences**, v. 77, p. 1030 – 1043, 2005.

CUNHA, T. S. et al. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo de ratos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 3, 532 – 540, 2006.

D'ASCENZO, S. et al. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. **Toxicology Letters**, v. 169, p. 129 – 136, 2007.

DAVID, H. G. et al. Simultaneous bilateral quadriceps rupture: a complication of anabolic steroid abuse. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 77, n. 1, p. 159 – 160, 1995.

DAWSON, R.T. Drugs in sport – the role of physician. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 55 – 61, 2001.

DeNARDI, C. et al. Type-2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 4, p. 823 – 835, 1993.

DJONOV, V. et al. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. **Circulation Research**, v. 86, p. 286 – 292, 2000.

DJONOV, V.; BAUM, O.; BURRI, P. H. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. **Cell Tissue Research**, v. 314, p. 107 – 117, 2003.

DVORAK, H. F. Angiogenesis: update 2005. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1835 – 1842, 2005.

ENGLISH, K. M. et al. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Circulation**, v. 102, p. 1906 – 1911, 2000.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 534 – 542, 2004.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n. 14, p. 2413 – 2422, 1996.



FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J.; The biology of vascular endothelial growth factors and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, p. 669 – 676, 2003.

GAVIN, T. P. et al. Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 19 – 24, 2004.

GAVIN, T. P. et al. Acute resistance exercise increase skeletal muscle angiogenic growth factor expression. **Acta Physiologica**, v. 191, p. 139 – 146, 2007.

GAVIN, T. P.; WAGNER, P. D. Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 1219 – 1226, 2001.

GEORGIEVA; K. N.; BOYADJIEV, N. P. Effects of nandrolone Decanoate on VO<sub>2</sub> max, running economy, and endurance in rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 36, n. 8, p. 1336 – 1341, 2004.

GIBSON, U. E. M.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Methods**, v. 6, p. 995 – 1001, 1996.

GOMES, O. et al. Hipogonadismo secundário – caso clínico. **Casos Clínicos**, v. 12, n. 1, p. 32 – 36, 2005.

GRINSPOON, S. et al. Effects of testosterone and progressive resistance training in eugonadal men with aids wasting. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, p. 348 – 355, 2000.

GUSTAFSSON, T. et al. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 2137 – 2146, 2005.

HAAS, T. L. et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, p. H1540 – H1547, 2000.

HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscle of mouse, rat, and rabbit. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 733 – 743, 1993.

HAMILTON, M. T.; BOOTH, F. W. Skeletal muscle adaptation to exercise: a century of

progress. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 327 – 331, 2000.

HARTGENS, F.; KUIPERS, H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. **Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p.513 – 554, 2004.

HARTGENS, F. et al. Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, p. 253 – 259, 2004.

HARTGENS, F. et al. Body composition, cardiovascular risk factors and liver function in long term androgenic-anabolic steroids using bodybuilders three months after drug withdrawal. **International Journal of Sports Medicine**, v. 17, p. 429 – 433, 1996.

HE, Z.; TESSIER-LAVIGNE, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphoring III. **Cell**, v. 90, p. 739 – 751, 1997.

IEMITSU, M. et al. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. **American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v. 291, p. H1290 – H1298, 2006.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 685 – 693, 2003.

JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1043 – 1050, 2004.

JENSEN, L.; BANGSBO, J.; HELLSTEN, Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 557.2, p. 571 – 582, 2004.

JOHANSEN, K. L.; MULLIGAN, K.; SCHAMBELAN, M. Anabolic effects of nandrolone decanoate in patients receiving dialysis. **JAMA**, v. 281, p. 1275 – 1281, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

KADI, F. et al. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. **Histochem. Cell Biol.**, v. 113, p. 25 – 29, 2000.

KARP, J. R. Muscle fiber types and training. **Strength and Conditioning Journal**, v. 23, n.5, p. 21 – 26, 2001.

KAWASAKI, T. et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. **Development**, v. 126, p. 4895 – 4902, 1999.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Vascular endothelial growth factors and its receptors. **Cytokine & Growth Factors Reviews**, v. 7, n. 3, p. 259 – 270, 1996.

KROLL, J.; WALTENBERGER, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, p. 636 – 639, 1999.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 411 – 434, 2002.

KURZ, H.; BURRI, P. H.; DJONOV, V. G. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. **News in Physiological Science**, v. 18, p. 65 – 70, 2003.

LI, X.; ERIKSSON, U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. **International Journal of Biochemistry & Cellular Biology**, v. 33, p. 421 – 426, 2001.

LISE, M. L. Z. et al. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 364 – 370, 1999.

MARAVELIAS, C. et al. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. **Toxicology Letters**, v. 158, p. 167 – 175, 2005.

MARQUETI, R. C. et al. Análise qualitativa dos tendões de ratos submetidos à terapia com EAA associada ao exercício físico de alta intensidade. **Motriz: Revista de Educação Física – UNESP**, v. 9, n. 1, p. S109 – S200, jan/abr.: 2003. Suplemento.

MARQUETI, R.C. et al. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p. 1274 – 1280, 2006.

MARQUETI, R. C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **International Journal of Sports Medicine**, v. 28, p. 1 – 5, 2008.

MASEK, T. et al. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p. 46 – 50, 2005.

MAYNARD, S. E, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 649 – 658, 2003.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MINAMOTO, V. B. Classificação e adaptação das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 50 – 55, 2005.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MOTTRAM, D. R.; GEORGE, A. J. Anabolic steroids. **Bailliere Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 55 – 69, 2000.

NASH, A. D. et al. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, p. 61 – 69, 2006.

NAVARRO, J. F. et al. Randomized prospective comparison between erythropoietin and androgens in CAPD patients. **Kidney International**, v. 61, p. 1537 – 1544, 2002.

NIEMINEN, M. S. et al. Serious cardiovascular side effects of large doses of anabolic steroids in weight lifters. **European Heart Journal**, v. 17, p. 1576 – 1583, 1996.

OLOFSSON, B. et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 93, p. 2576 – 2581, 1996.

OLSSON, A. K. et al. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. **Nature Reviews**, v. 7, p. 359 – 369, 2006.

OTROCK, Z. K.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A. I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 38, p. 258 – 268, 2007.

PECHÁŇOVÁ, O.; ŠIMKO, F. The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. **Physiological Research**, v. 56, n. 2, p. S7 – S16, 2007.

PEUKER, H.; PETTE, D. Quantitative analyses of myosin heavy-chain mRNA and protein isoforms in single fibers reveal a pronounced fiber heterogeneity in normal rabbit muscle. **European Journal Biochemistry**, v. 247, p. 30 – 36, 1997.

PRESTA, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 159 – 178, 2005.

PRIOR, B. M.; YANG, H. T.; TERJUNG R. L. What make vessels grow with exercise training? **Journal of Applied Physiology**, v. 97, p. 1119 – 1128, 2004.

RABKIN, J. G.; WAGNER, G. J.; RABKIN, R. A double-blind, placebo-controlled trial of testosterone therapy for HIV-positive men with hypogonadal symptoms. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, p. 141 – 147, 2000.

RICHARDSON, R. S. et al. Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. **American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v. 277, p. 2247 – 2252, 1999.

RIVILIS, I. et al. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch-versus shear stress-induced angiogenesis. **American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v. 283, p. H1430 – H1438, 2002.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2879 – 2887, 2006.

RYAN, N. A. et al. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, p. 178 – 185, 2006.

SANTOS, A. M. **O mundo anabólico**. 2.ed. Barueri: Manole, 2007.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**, v. 23, n. 9, p. 1355 – 1390, 2001.

SHIBUYA, M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. **Cell Structure and Function**, v. 26, n. 3, p. 25 – 35, 2001.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 9, p. 225 – 230, 2006.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 549 – 560, 2006.

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235 – 243, 2002.

SINHA-HIKIM, I. et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 283, p. E154 – E164, 2002.

STARON, R. S. The classification of human skeletal muscle fiber types. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 11, n.2, p. 67, 1997.

TAMMELA, T. et al. The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 550 – 563, 2005.

THEIN, L. A.; THEIN, J. M.; LANDRY, G. L. Ergogenic aids. **Physical Therapy**, v. 75, n. 5, p. 426 – 439, 1995.

TRENERRY, M. K. et al. STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, p. 1483 – 1489, 2007.

URHAUSEN, A.; ALBERS, T.; KINDERMANN, W. Are the cardiac effects of anabolic steroids abuse in strength athletes reversible? **Heart**, v. 90, p. 496 – 501, 2004.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 9, p. 211 – 220, 1999.

VELAZQUEZ; I.; ALTER, B. P. Androgens and liver tumors: fanconi's anemia and non-fanconi's conditions. **American Journal of Hematology**, v. 77, p. 257 – 267, 2004.

VISURI, T.; LINDHOLM, H. Bilateral distal biceps tendon avulsions with use of anabolic steroids. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 26, n. 8, p. 941 – 944, 1994.

WAGNER, P. D. et al. Muscle targeted deletion of VEGF and exercise capacity in mouse. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 151, p. 159 – 166, 2006.

WATERS, R. E. et al. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 287, p. C1342 – C1348, 2004.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835 – 870, 2003.

YUAN, L. et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. **Development**, v. 129, p. 4797 – 4806, 2002.

## ANEXO

Anexo 1. Tabela de peso dos animais com as pesagens realizadas durante todo o protocolo experimental.

TABELA DE PESO – Grupo S (sedentário)						
DATA	CABEÇA	RABO	DORSO	BARRIGA	PATA D.	
30/jan	192	203	209	203	186	semana adaptação
1/fev	207	209	223	208	193	
3/fev	222	220	230	215	200	
6/fev	232	236	205	235	214	carga 50%
8/fev	258	239	252	243	216	
10/fev	254	259	251	250	221	60%
13/fev	261	253	274	265	233	
15/fev	276	255	277	267	234	
17/fev	275	260	280	263	239	65%
22/fev	297	274	302	277	248	
24/fev	399	274	305	281	353	
27/fev	311	285	315	293	260	70%
1/mar	315	290	320	305	260	
3/mar	318	288	318	300	265	
6/mar	320	296	325	308	267	75%
8/mar	327	300	327	320	270	
10/mar	329	307	328	315	270	
13/mar	336	309	335	317	276	80%
15/mar	342	280	340	322	277	
17/mar	348	318	352	336	288	
20/mar	360	328	358	350	294	
22/mar	360	330	360	349	295	



<b>TABELA DE PESO – Grupo EAA</b>						
DATA	CABEÇA	RABO	DORSO	BARRIGA	PATA D.	
30/jan	211	204	222	267	215	semana adaptação
1/fev	232	215	238	283	239	
3/fev	250	222	252	297	247	
6/fev	260	232	259	291	260	carga 50%
8/fev	280	240	268	311	273	
10/fev	293	244	263	322	280	
13/fev	276	223	255	306	267	60%
15/fev	297	236	279	319	285	
17/fev	314	248	290	330	305	
20/fev	324	256	295	350	319	65%
22/fev	343	262	310	352	322	
24/fev	348	267	308	348	325	
27/fev	365	278	317	363	340	70%
1/mar	372	280	318	361	342	
3/mar	369	288	320	356	342	
6/mar	384	294	330	363	352	75%
8/mar	383	300	330	368	350	
10/mar	383	301	328	368	355	
13/mar	393	306	330	366	358	80%
15/mar	401	311	337	371	370	
17/mar	399	317	338	376	375	
20/mar	424	328	350	380	386	

<b>TABELA DE PESO - Grupo Treinado (T)</b>						
DATA	CABEÇA	RABO	DORSO	BARRIGA	PATA D.	
30/jan	232	231	219	177	207	senama adaptação
1/fev	235	238	230	183	215	
3/fev	240	250	240	195	230	
6/fev	250	265	260	211	238	carga 50%
8/fev	255	274	266	220	250	
10/fev	258	283	284	227	260	
13/fev	274	292	299	244	278	60%
15/fev	269	290	303	247	286	
17/fev	275	298	298	250	295	
20/fev	285	303	317	261	306	65%
22/fev	285	307	325	262	320	
24/fev	288	314	333	270	326	
27/fev	298	324	355	284	343	70%
1/mar	300	325	360	287	340	
3/mar	297	325	365	297	357	
6/mar	298	322	354	280	342	75%
8/mar	313	332	375	297	353	
10/mar	313	330	375	298	359	
13/mar	325	342	285	307	358	80%
15/mar	323	340	381	306	343	
17/mar	330	344	391	315	354	
20/mar	335	348	400	328	360	

<b>TABELA DE PESO – Grupo EAAT</b>						
DATA	CABEÇA	RABO	DORSO	BARRIGA	PATA D.	
30/jan	204	189	214	260	230	semana adaptação
1/fev	214	200	220	270	245	
3/fev	220	210	230	283	253	
6/fev	223	216	234	260	262	carga 50%
8/fev	233	230	238	306	275	
10/fev	236	235	249	319	282	60%
13/fev	257	248	262	330	290	
15/fev	251	247	265	337	302	
17/fev	257	260	257	345	307	65%
20/fev	266	268	279	353	320	
22/fev	269	272	281	262	328	
24/fev	276	273	290	364	339	70%
27/fev	278	284	296	372	345	
1/mar	280	285	290	376	345	
3/mar	273	285	296	372	349	75%
6/mar	276	295	298	374	350	
8/mar	278	298	301	374	351	
10/mar	283	299	296	320	353	80%
13/mar	275	292	228	368	344	
15/mar	286	299	301	377	355	
17/mar	292	302	310	380	361	
20/mar	285	303	306	375	358	