

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DIEGO ADORNA MARINE

**Expressão de Miostatina e Folistatina em Ratos Castrados
Submetidos a Exercício**

**SÃO CARLOS
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DIEGO ADORNA MARINE

**Expressão de Miostatina e Folistatina em Ratos Castrados
Submetidos a Exercício**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu 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.

Área de concentração: Fisiologia Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Mercie de Oliveira Leal.

SÃO CARLOS

2012

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

M338em Marine, Diego Adorna.
Expressão de miostatina e folistatina em ratos castrados submetidos a exercício / Diego Adorna Marine. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
44 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisiologia. 2. Miostatina. 3. Folistatina. 4. Exercícios. I. Título.

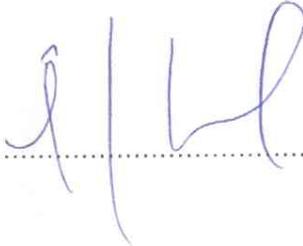
CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Diego Adorna Marine

Dia 19/07/2012

Prof^a. Dr^a. Ângela Merice de Oliveira Leal.....

Prof. Dr. João Paulo Botero.....

Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Everaldo e Maria Claudete, fundamentais para que chegasse a este grau de colação no ensino. Sem seus conselhos, seu apoio, e interesse em meu futuro, não teria conseguido chegar a este tão sonhado momento.

Dedico também a minha namorada Geórgia, que sempre se dedicou a mim, me ajudando, respeitando meus interesses, minha falta de tempo com ela, e acima de tudo me incentivando nos piores momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, mestre que está sempre ao nosso lado, nos auxiliando e colocando o caminho certo para seguirmos em nossas vidas.

Agradeço aos meus pais Everaldo e Maria Claudete, pelo seu infinito apoio, dedicação e conselhos.

Agradeço à minha namorada Geórgia, pela sua alegria e esperança que sempre depositou em mim, a qual espero ter correspondido, e não decepcioná-la.

Agradeço ao meu primo Marcelo, fonte de inspiração de meus estudos, e de grande determinação. É um grande exemplo para mim, e que seguirei para o resto da vida.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Luciana, Danilo, e Guilherme, que dedicaram seus escassos tempo em ajudar-me no treinamento de meus ratos.

Agradeço a professora Keico, que gentilmente cedeu o espaço de seu biotério e laboratório para que pudesse fazer esta pesquisa.

Por fim, agradeço também ao meu amigo Mateus que muito me ajudou na resolução de problemas provenientes desta pesquisa, e também de grande ajuda e parceria nos estudos que passavam a madrugada.

ABSTRACT

Myostatin and Follistatin Expression in Orchidectomized Rats Submitted to Exercise.

¹Marine DA, ¹Bueno PG, ¹Silva R N, ¹Selistre-Araújo H S, ¹Nonaka KO, ²Leal_A M O.

Departments of ¹Physiological Sciences and ²Medicine of Federal University of São Carlos, São Carlos-SP, Brazil.

Myostatin (MSTN) is a negative regulator of skeletal muscle growth, while androgens are strong positive regulators of muscle growth and strength. Follistatin (FS) is a non-related protein which inhibits MSTN action. The mechanisms of androgens actions are not fully elucidated and evidences suggest that MSTN and testosterone muscle actions may be associated. The objective of this study was to evaluate the influence of exercise training in the expression of MSTN and FS of orchidectomized rats submitted to exercise. Adult male Wistar rats were housed under controlled conditions (20-22^o C, 12h light-dark cycle) and were allowed free access to standard rodent chow. After 3 days of acclimation, rats were orchidectomized (O) or sham-operated (S). One group of animals was maintained intact (I). After 1 week, animals were randomly assigned to a training group (O-Train, S-Train and I-Train) or a sedentary group (O-Sed, S-Sed and I-Sed). An 8-week resistance-training period, during which the animals climbed a 1.1-m vertical ladder with weights attached to their tails, was realized. The sessions were performed three times a week, with 4-9 climbs and 8-12 dynamic movements per climb, that were increased the weight for each climb, and new maximum weight was obtained for new session. The training lasted eight weeks. After this period, rats were decapitated. White gastrocnemius muscle were dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70^o C for subsequent analysis. MSTN and FS mRNA was quantified by real time RT-PCR. The animals were maintained according to the local University Committee guidelines for the care and use of laboratory animals. $P < 0.05$ was considered statistically significant. MSTN mRNA expression was significantly higher in gastrocnemius muscle of O-Sed group than in I-Sed group. FS mRNA expression was significantly lower in S-Train and O-Train groups than in I-Sed and I-Train groups. The results indicate that MSTN expression increases in skeletal muscle of orchidectomized rats

and is not influenced by resistance training. FS mRNA can to be influenced for resistance training and other hormones or proteins.

RESUMO

Expressão de Miostatina e Folistatina em Ratos Castrados Submetidos a Exercício.

¹Marine DA, ¹Bueno PG, ¹Silva R N, ¹Selistre-Araújo H S, ¹Nonaka KO, ²Leal_A M O.

Departamentos de Ciências Fisiológicas¹ e Medicina² da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, Brazil.

A Miostatina (Mstn) é uma reguladora negativa do crescimento do músculo esquelético, enquanto androgênios são fortes reguladores positivos do aumento muscular e de força. A Folistatina (Fstn) é uma proteína não relacionada que inibe a ação da Mstn. Os mecanismos de ações dos androgênios não são totalmente compreendidos e evidências mostram que as ações de Mstn e testosterona podem estar associadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do treinamento físico sobre a expressão da Mstn e Fstn de ratos castrados submetidos a exercício. Ratos adultos Wistar, machos, foram alocados em condições controladas (20-22°C, ciclo claro/escuro de 12h), ração para roedores e água *ad libitum*. Depois de 3 dias de aclimação, os ratos foram castrados (C) ou submetidos a cirurgia fictícia “sham” (S). Um grupo de animais foi mantido intacto (I). Depois de uma semana, os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupo treinamento (TC, TS e TI), ou grupo sedentários (SC, SS e SI). Durante o período de 8 semanas de treinamento resistido, os animais escalaram uma escada vertical de 1.1 m, com pesos de chumbo atados em suas caudas. As sessões foram feitas 3 vezes por semana, com 4-9 escaladas de 8-12 movimentos dinâmicos por escalada, em que aumentava-se o peso para cada escalada, e assim nova carga máxima era obtida para a próxima sessão de treino. Ao final do treinamento, os ratos foram decaptados. O músculo gastrocnêmio branco foi dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C para subsequente análise. Os animais foram mantidos de acordo com as diretrizes do comitê de ética da Universidade local para cuidado e uso de animais de laboratório. $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. A Expressão do mRNA da Mstn foi significativamente maior no grupo SC comparado com SI. A Expressão do mRNA da FS foi significativamente menor nos grupos TS e TC em relação aos grupos SI e TI. Os resultados indicam que a expressão do mRNA de Mstn aumenta no músculo esquelético de ratos castrados e

não é influenciada pelo treinamento resistido, e outros hormônios anabólicos como GH e proteínas, como o IGF-1 podem ter influenciado nos resultados da Fstn.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. HIPÓTESE E OBJETIVO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais e Condições Experimentais	20
3.2. Grupo Sedentário	21
3.2.1. <i>Procedimentos Cirúrgicos da Castração (Orquidectomia) e da operação fictícia ...</i>	21
3.4. Protocolo de treinamento	21
3.5. Controle da ingestão alimentar e da massa corporal	24
3.6. Preparação do tecido	24
3.7. Expressão Gênica	24
3.7.1. <i>Extração e controle de qualidade de RNA total</i>	24
3.7.2. <i>Transcrição reversa</i>	26
3.7.3. <i>PCR em tempo real</i>	26
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: esquema da atuação da Miostatina (Mstn). Elkina et al. 2011.	15
Figura 2: Distribuição dos animais em 6 grupos experimentais.....	21
Figura 3: Protocolo de treinamento de força	22
Figura 4: A) Desenho do protocolo de treinamento das sessões de treino, B) Dias de treino semanal.....	24
Figura 5: gel de agarose.	25
Figura 6: Curva de MELT da Mstn	27
Figura 7: Curva de amplificação do qRT-PCR.....	28
Figura 8: Curva de amplificação do qRT-PCR com o limiar de amplificação demonstrado (Ct), de 0,05.	28
Figura 9: Massa corporal dos animais (média ± EPM). * P < 0,05. SI vs TC.....	30
Figura 10: Expressão do RNAm da Miostatina (Mstn). * P < 0,05. SC vs SI.	31
Figura 11: Expressão do RNAm da Folistatina (Fstn). P < 0,05, * TS vs SI e TC vs SI e # TS vs TI, e TC vs TI.	32

1. INTRODUÇÃO

A Miostatina (Mstn) também conhecida como GDF-8 (Fator de Crescimento e Diferenciação - 8) descoberta em 1997 é uma proteína da família TGF- β (Fator de Crescimento Transformador - β), que contém 35 membros peptídicos, entre eles as GDFs, as BMPs (Proteína Ossea Morfogenética) e os próprios TGFs. A Mstn é sintetizada, quase exclusivamente pelo músculo esquelético, e secretada, com atuação parácrina e autócrina, atuando sobre seu receptor de membrana. Ela é de fundamental importância para a regulação da massa muscular (McPherron et al. 1997; Zimmers, et al., 2002).

A Mstn, vem sendo alvo de diversas pesquisas relacionando-a ao desenvolvimento do músculo esquelético. Camundongos com ausência do gene da Mstn possuem aumento de massa muscular de 100 a 200%. A Mstn tem principal atuação no período embrionário, porém na fase adulta do animal, também atua sobre o tamanho celular, ou seja, sobre a hipertrofia muscular (McPherron, et al., 1997; Lee and McPherron, 2001; and Zimmers, et al., 2002).

A Mstn é sintetizada como pré-próteína com 375 aminoácidos e com massa molecular de 55 kd, que sofre duas clivagens, uma na sua porção N-terminal com peso molecular de 26 kd e outra na porção C-terminal, com peso molecular de 12,5 kd (carboxi-terminal). É o principal regulador extra-celular da massa muscular. A Mstn tem sido avaliada como tratamento para pacientes com diabetes, câncer e AIDS. Adicionalmente tem sido alvo de grande exploração comercial como suplementos que prometem inibir a Mstn causando hipertrofia muscular (Matsakas et al., 2005). A pré-próteína da Mstn não tem efeito biológico, sendo a porção clivada a forma ativa, precisamente a porção carboxi-terminal, que é a mais encontrada em ratos velhos (Kovacheva, E. L. et al., 2010).

O aumento da massa muscular em animais “*Knock-out*” da Mstn é atribuído à proliferação das células satélites associada à fibra muscular, que têm sido identificadas como a origem de novos tecidos musculares durante crescimento e regeneração (Kocamis e Killefer, 2002). Porém um estudo *in vitro* feito por Amthor et al. (2009), mostrou que a hipertrofia na ausência da Mstn envolve pouco ou nenhuma célula satélite, e menor número de mionúcleos são encontrados. No entanto, há grande aumento de área de secção transversa e de miofibrilas,

indicando que a Mstn tem papel fundamental não apenas sobre o ciclo celular, mas também na hipertrofia celular.

O receptor da Mstn é o receptor de activina, chamado de ActRIIB, e o outro receptor é o receptor de activina quinase tipo I (ALK-4 ou ALK-5), sendo que este depende da ligação da Mstn ao ActRIIB, e que por sua vez, forma um complexo que ativa o receptor ALK. Através da ligação da Mstn ao seu receptor, é desencadeada uma cascata de sinalização de inibição da hipertrofia e estimulação da sinalização da via da atrofia, regulando o crescimento muscular. Porém, estes mecanismos não são totalmente entendidos (Walsh and Celeste, 2005; Ji et al., 2008; Amirouche et. al., 2010).

A ação da Mstn sobre o tamanho do músculo esquelético acontece por duas vias, uma de inibição de proteínas “*upstream*” que estimulam a hipertrofia, como PDK1 (Fosfoinositideo dependente de proteína quinase-1) e PI3K (Fosfatidilinositol-3-quinase), que estimulam a *Akt*, que por sua vez estimulará a mTOR (proteína alvo da rapamicina), e que estimula proteína ribossomal S6K (p70S6K), que é um fator transcricional, e tem papel de promover a síntese proteica (Sakuma & Yamaguchi, 2010).

Amirouche et. al, 2009, demonstraram que a Mstn diminui a atividade do complexo *Akt*/mTOR em 40 %, diminuindo assim a hipertrofia. No entanto, ela também estimula a via da atrofia, estimulando as Smads 2 e 3, que vão se unir a Smad 4 formando um complexo que vai ao núcleo e aumenta a atividade transcricional do DNA de enzimas relacionadas à apoptose (Kolias and Mcdermont, 2008, Lee and McPherron, 2001, Aoki et al, 2009), aumentando a via da atrofia muscular.

A Mstn inibe ainda a proliferação e diferenciação do ciclo celular através da inibição de fatores regulatórios miogênicos (MRF), como a *Pax-3*, *Myf-5* e *Myo-D*, (Rodino-Kaprac et al., 2009). A estimulação destas proteínas como a *Pax-7* e *Myf-5*, que são responsáveis pela estimulação da proliferação da ação da proteína *Myo-D* e *Myogenin*, que são grandes responsáveis pela estimulação da diferenciação celular. Esta é uma ação poderosa da Mstn na regulação da hiperplasia.

A *Myo-D* tem a expressão aumentada em ratos “*Knock-out*” da Mstn, e a *PAX-7* aumenta sua expressão com a inibição da Mstn (McFarnale et. al, 2007).

Na Figura 1, observa-se um esquema simplificado da sinalização da Mstn em diversas vias de atuação, como hipertrofia, ciclo celular e atrofia. São propostas de como é hipotetizada, a sinalização da Mstn.

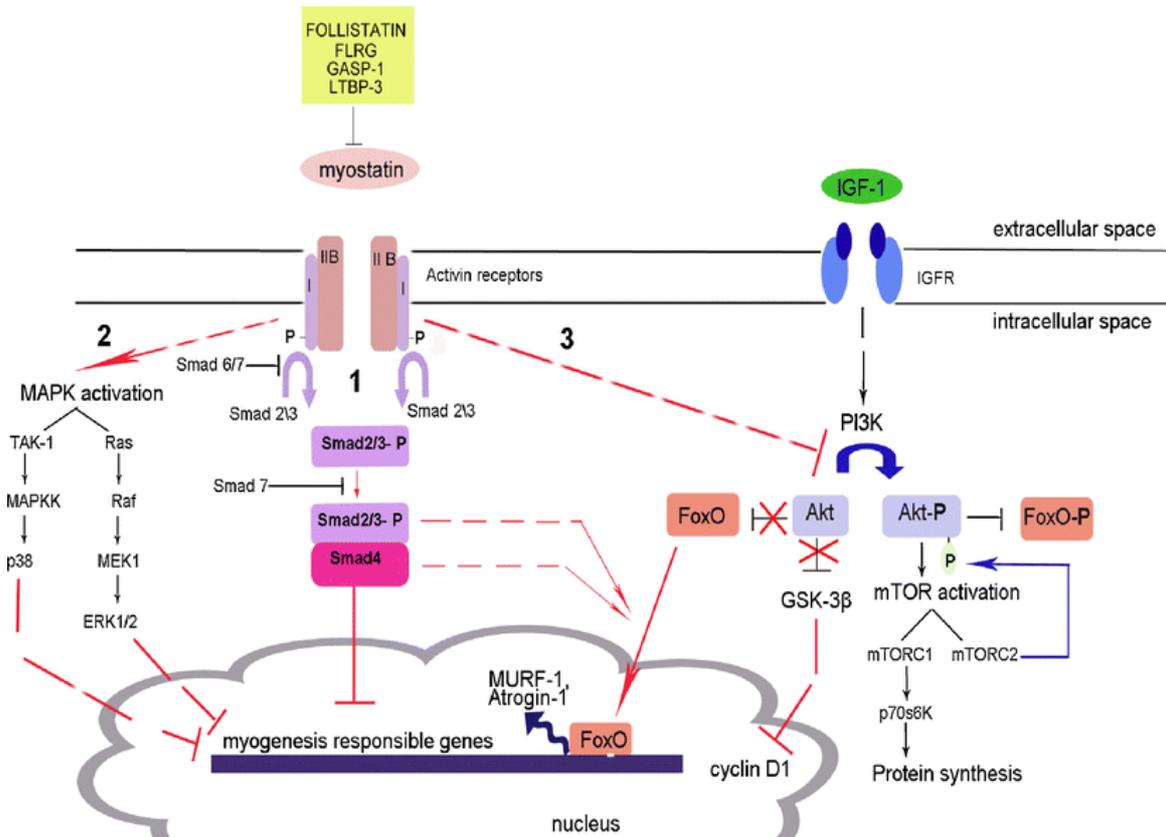


Figura 1: esquema da atuação da Miostatina (Mstn). Elkina et al. 2011.

Estes possíveis mecanismos regulatórios da Mstn sobre o músculo são a inibição da proliferação do mioblasto *in vitro*, fazendo com que o mioblasto permaneça na fase G1 do ciclo celular, e não prossiga para a fase S (síntese de DNA). A interrupção do crescimento muscular é devido a um aumento do p21, uma CKI (Quinase inibitória de ciclinas), que promove uma diminuição da Cdk2 (ciclinas dependentes de quinases). A atividade da Cdk2 promove a atividade do retinoblastoma (Rb), envolvida no ciclo celular aumentando assim a proliferação e diferenciação celular. A hipofosforilação do Rb pela inibição da cdk leva a célula a permanecer na fase G1 (Thomas et al, 2000). Além disso, a Mstn também inibe a diferenciação do mioblasto por uma via que inibe a expressão da MyoD via Smad 3 (Matsakas et al, 2005).

Ji et al. (2008), demonstraram que o aumento da expressão da Mstn, aumentou a expressão da proteína PTEN (um tumor supressor), que inibe a Akt,

que por sua vez deixa de inibir a proteína p300. A p300 é uma proteína com atividade de marcação para proteínas que entrarão em apoptose, sendo degradadas por um proteossoma, e neste caso degrada o complexo ciclina D-1 e a quinase dependente de ciclina (CDK), que são promotoras do ciclo celular. As cdk's são as proteínas finais que estão presentes nas fases G1 e G2, antes da mitose. Neste caso, a Mstn tem mais de um meio para realizar inibição do ciclo celular, como demonstrado na figura 1.

No entanto, existem várias formas de inibir a Mstn, seja pela ligação com ela, como a Folistatina (Fstn), o mais citado e responsável pela ligação extracelular (Gilson et al., 2009; Haidet et al., 2008; Lee and McPherron, 2001; Nakatami et al., 2011; Welle et al., 2009; Kollias et al., 2008; Aoki et al., 2009; Rodino-Kaplan et al., 2009; and Lee, 2007), ou outros inibidores, como o gene relacionado semelhante a folistatina (FLRG), proteína 1 sérica associada a fator de diferenciação e crescimento (GASP-1) (Haidet et al., 2008; ; Nakatami et al., 2011; Aoki et al., 2009; Rodino-Kaplan et al., 2009; and Lee, 2007). Sabe-se muito pouco ainda a respeito da Fstn, assim como da ação dela ou de outros inibidores sobre o mecanismo de ação da Mstn.

A Fstn é uma glicoproteína, inicialmente identificada no fluido folicular ovariano de porcas, e recebeu este nome porque ela suprime a síntese e secreção do hormônio folículo-estimulante. Seu gene localiza-se no cromossomo 5q11.2 e contém 6 exons. Tem duas isoformas através de splicing alternativo, pelo qual uma permanece com 5 exons (FS-288) e a outra isoforma mantém os 6 exons (FS-315). A FS-288 tem atuação nos tecidos pois sua forma é mais rica em aminoácidos que se ligam à heparina e por isso tem mais afinidade (Rodino-Kaplan et al., 2009).

Até o momento, pouco se sabe sobre o mecanismo de inibição da Mstn pela Fstn, porém no trabalho de Lee (2001), animais "Knock-out" Mstn^{-/-} e que tiveram aumento da expressão de Fstn, tiveram um aumento de massa muscular quatro vezes maior que os animais controle. Gilson et al., 2009 demonstraram que a injeção de Fstn causou grande aumento de massa muscular comparado com perna contralateral de ratos, e também não inibiu o ciclo celular, que foi controlado por radiação γ , indicando que a hipertrofia causada pela Fstn é dependente apenas de uma via de hipertrofia.

Há também os fatores de crescimento que exercem função antagônica à Mstn nas proteínas intracelulares chaves para a via de sinalização, tanto da hipertrofia como do ciclo celular, como o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), e a testosterona (Jones et. al., 2009). A Testosterona é um dos principais hormônios anabólicos, visto que promove grande aumento de massa muscular quando administrado exogenamente, e sua ação é dose-dependente (Bhasin et al., 1996; Bhasin et al., 2001; Sinha-Hikim et al., 2002; e Schoroeder et al., 2003). É um hormônio derivado do colesterol, produzido e secretado pelos testículos e em menor quantidade pelas células da zona reticulada da glândula supra-renal.

Sinha-Hikim et al. (2002) foram os primeiros a demonstrar que a testosterona causa hipertrofia também pelo aumento de mionúcleo, ou seja, influenciando o ciclo celular em células miogênicas. Kovacheva et al. (2010) demonstraram que a testosterona estimula o crescimento celular através da inibição da atrofia e apoptose, assim como estimula a proliferação e diferenciação do ciclo celular.

A testosterona estimula a proteína Notch, que é uma promotora da ativação e proliferação de células satélites através da ativação de MRFs que inibem a CKI p21, que é inibidora da cdk, causando diminuição do processo de atrofia causado pela Mstn. A testosterona também inibe a JNK que é uma proteína estimuladora da CKI p21, e estimula a p38 MAPK que é uma inibidora da Mstn e do processo de apoptose (morte celular programada). Sendo assim, a testosterona inibe apoptose e atrofia, e estimula a proliferação de novos miotubos que se unirão a fibras preexistentes, ou migrarão para outro local (Kovacheva et al. 2010).

A testosterona ainda pode estimular a Akt, que por sua vez deve inibir a Caspase-2, proteína-chave para a apoptose. Ela também pode inibir a Mstn de maneira direta, no entanto, o entendimento da via de sinalização da testosterona sobre o ciclo celular e sobre a atrofia e apoptose ainda não é totalmente compreendido (Kovacheva et al. 2010).

Sighn et al. (2009), demonstraram que a testosterona junto ao receptor de andrógeno (AR) e a β -Catenina, translocam-se para o núcleo promovendo a transcrição de genes reguladores da ação da Mstn, assim como de MRFs, como a MyoD e Miogenina.

Hoje ainda não se sabe totalmente os efeitos da Mstn, Fstn e testosterona, porém, sabe-se que a Mstn é um mediador da sarcopenia e Fstn e testosterona, entre outros, são mediadores do ganho de massa muscular. No entanto, mesmo animais “knock-out” para Mstn entram em processo de sarcopenia durante o envelhecimento, como foi mostrado pelo estudo de Morissette et. al. (2009), com camundongos “Knock-out” e envelhecidos.

No músculo esquelético de adultos, a sobrecarga crônica atenua a sarcopenia pela indução da hipertrofia e força (Kim et al. 2005). Jones et al., 2009, relacionam a sarcopenia com dois fatores: a diminuição de síntese protéica, por causa da diminuição da produção e secreção de hormônios anabólicos como GH e Testosterona, durante o envelhecimento, e ainda o aumento da degradação protéica, com o desuso e aumento da Mstn e citocinas.

Vários estudos têm demonstrado que o treinamento resistido aumenta a massa muscular (Goto et al. 2004; Barstow et al. 2003; Kraemer and Ratamés, 2004) e trabalhos mais recentes têm demonstrado que o treinamento resistido é capaz de promover regulação da Mstn e outras proteínas, que estão ligados à hipertrofia (Hulmi et al. 2009; Garma et al. 2007).

As diretrizes do American College of Sports Medicine (2009), indicam o exercício físico, e nele contido o treinamento resistido, para diminuir a frequência de doenças, perda de massa muscular, perda de força e equilíbrio, e melhorar auto-estima, entre outros benefícios, sendo considerado a melhor terapia não farmacológica.

Em estudos feitos com idosos, o treinamento resistido mostrou-se uma excelente alternativa para ganho de massa muscular e força, com regulação direta da Mstn e promovendo melhorias da qualidade de vida desta população (Barstow et. al, 2003; Kraemer e Ratamés, 2004; Garma et. al, 2007).

No entanto, nosso estudo foi feito com animais adultos, e não idosos, e a castração realizada em nosso estudo serviu para aproximarmos o efeito da andropausa encontrado em idosos, ou animais envelhecidos. Portanto, a pergunta que tentamos responder é se retirarmos a testosterona do organismo, qual seria o resultado encontrado, em especial sobre a massa muscular e expressão da Mstn que é muito expressa no envelhecimento?

2. HIPÓTESE E OBJETIVO

Hipotetizamos que a castração aumentaria a expressão da Mstn, contribuindo para a sarcopenia, que é um processo fisiológico do envelhecimento com diversas causas, como a diminuição da secreção de hormônios anabólicos como a testosterona e o hormônio do crescimento (Jones e Knight, 2009), e a Mstn envolvida na regulação da massa muscular pode ser uma molécula chave para entendermos a sarcopenia (Jones e Knight, 2009). Também hipotetizamos, que o exercício de força poderia inibir a Mstn nos animais intacto e sham. Também hipotetizamos que o treinamento de força restauraria os níveis basais do equilíbrio entre anabolismo e catabolismo, pela expressão da Mstn, mesmo na ausência de Testosterona nos ratos castrados. O nosso objetivo foi avaliar a expressão de Mstn e Fstn no tecido muscular esquelético, assim como avaliar a influência da testosterona e do treinamento de força sobre a expressão gênica da Mstn e Fstn.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Condições Experimentais

Ratos Wistar machos, adultos, pesando $184 \pm 1,2g$ (média \pm desvio padrão) foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto. Dois ratos faleceram durante a execução da pesquisa, sendo um no dia do procedimento cirúrgico de castração e o outro duas semanas após.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura ($22^{\circ}C$), umidade e iluminação (8-18h: claro; 18-8h: escuro). Todos os animais permaneceram durante o experimento em condições de aclimação com oferta de água e dieta padrão *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo nº 034/2010).

Após aclimação, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, com 8 animais, sendo eles: sedentário intacto (SI); sedentário castrado (SC); treinado intacto (TI); treinado castrado (TC); sedentário Sham (SS); e treinado Sham (TS).

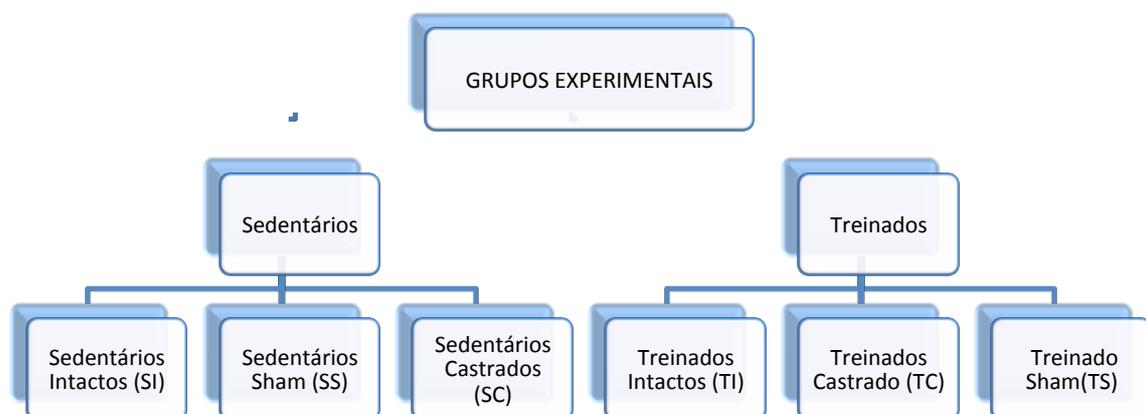


Figura 2: Distribuição dos animais em 6 grupos experimentais

3.2. Grupo Sedentário

Os animais denominados sedentários não realizaram qualquer tipo de treinamento durante todo o período do experimento.

3.2.1. Procedimentos Cirúrgicos da Castração (Orquidectomia) e da operação fictícia

Após o animal ser anestesiado com éter, a pele foi limpa com Alcool. Uma incisão foi feita através da pele da bolsa escrotal, e o testículo foi separado do tecido adjacente, e exposto. Então, a glândula foi removida após a ligadura do cordão espermático e mesmo procedimento foi feito no lado oposto para a retirada do outro testículo. Após a retirada dos testículos, os tecidos foram suturados.

Foi respeitado um período de 10 dias de recuperação pós-cirurgia para dar início aos procedimentos do protocolo de treinamento resistido.

3.4. Protocolo de treinamento

O protocolo utilizado foi o de Hornenberger e Farrar (2004), adaptado por Domingos et al. (2011). Inicialmente, os ratos foram familiarizados com o treinamento de força que consistiu em subida de escada (1,10 x 0,18m, 2 cm espaçamento entre os degraus, e 80° de inclinação) com aparatos fixados em suas caudas na sua porção proximal. Os animais, durante a subida da escada realizavam de 8 a 12 movimentos por subida, como se estivesse padronizando um treino de hipertrofia para humanos, porém, sem esquecer que ratos não estão fazendo o treino por vontade própria e também não tem consciência sobre os benefícios ou malefícios do exercício. O aparato fixado em suas caudas consistia de frascos cônicos de 100 ml que continham pesos de chumbo em seu interior, figura 3.

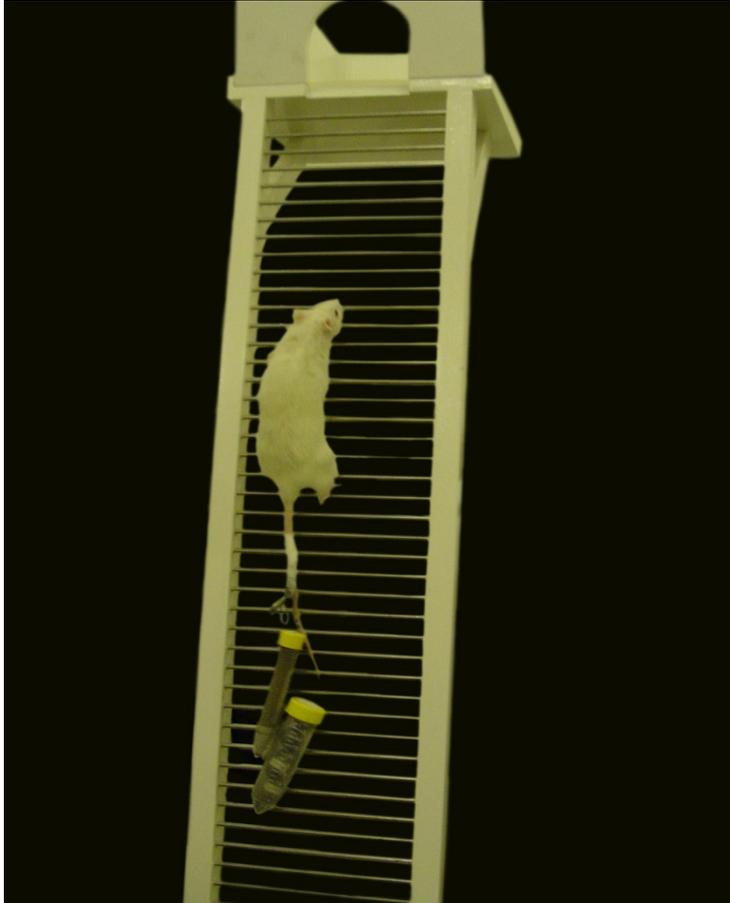


Figura 3: Protocolo de treinamento de força

Os ratos foram colocados na parte inferior da escada e adaptados ao ato de escalar.

Inicialmente, os animais foram motivados a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo com pinça para iniciar o movimento. No topo da escada, encontravam uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansavam por dois minutos. Este procedimento era repetido até que os ratos, voluntariamente, escalassem três vezes consecutivas a escada, sem que houvesse o incentivo na cauda. Os ratos fizeram um máximo de nove escaladas para o período de adaptação, assim como durante o treinamento.

Três dias seguintes à familiarização com a escada (dois dias de descanso e no terceiro dia treinamento novamente), os grupos experimentais começaram um regime de exercício de força progressiva.

A primeira e a segunda sessões de treinamento consistiram em quatro a oito escaladas carregando, progressivamente, cargas mais pesadas, afim de

determinar a carga máxima inicial (Teste e Reteste). Na escalada inicial, foi aplicado 75% do peso corporal do animal e após completar o carregamento desta carga, nova carga foi colocada com 90% do peso corporal, e na terceira tentativa era de 100% do peso corporal. Após atingir esta situação, um peso adicional de 30 gramas era adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga fosse alcançada, e não permiti-sse que o rato subisse a escada. Portanto, a maior carga carregada com sucesso até o topo da escada foi considerada a carga máxima dos ratos para aquela sessão. Esta carga foi utilizada para a prescrição da próxima sessão de treinamento. Teste e reteste de carga máxima foi feita para dar maior fidedignidade ao teste.

Após a carga máxima de carregamento ter sido determinada as sessões de treinos (quatro a nove escaladas) se iniciaram. Durante as primeiras quatro escaladas, os ratos carregavam 65%, 85%, 95% e 100% de suas cargas máximas, correspondentes a última sessão de treinamento. Durante as escaladas subseqüentes, um adicional de 30 gramas era adicionado até que o rato não subisse a escada voluntariamente em dois minutos, e assim, uma nova carga máxima de carregamento era determinada. As sessões de treino foram realizadas três vezes por semana, às segundas, quartas e sextas-feiras durante oito semanas. O início das sessões de treino ocorreu sempre às 14 horas. O intervalo de recuperação entre as escaladas foi de dois minutos. A figura 4 demonstra como foi feita a alocação das cargas de treino e com seus respectivos intervalos de repouso.

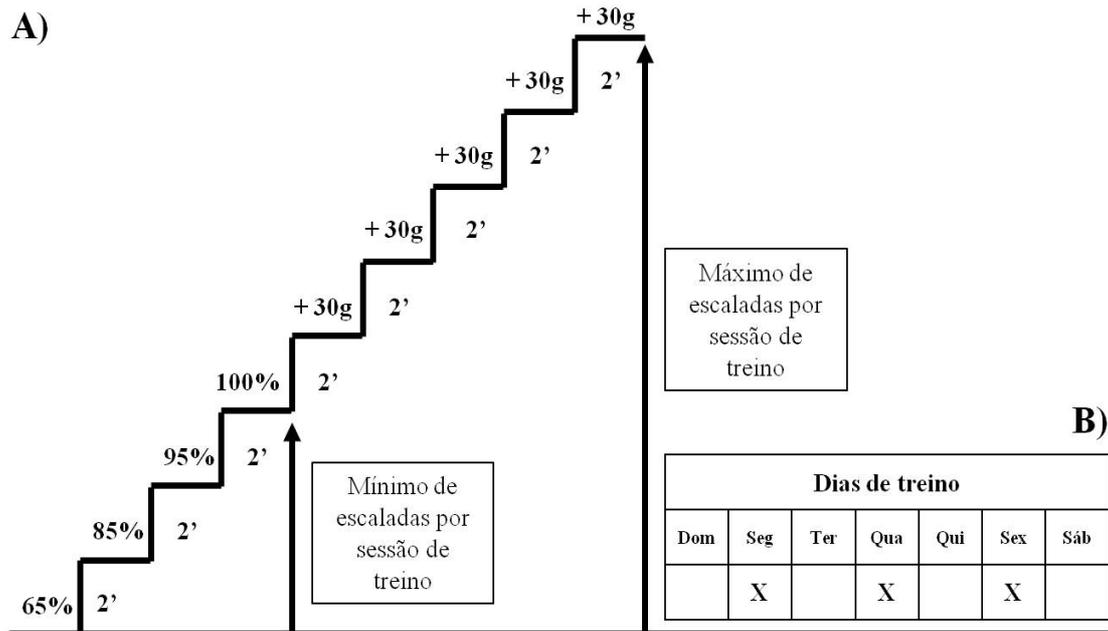


Figura 4: A) Desenho do protocolo de treinamento das sessões de treino, B) Dias de treino semanal.

3.5. Controle da ingestão alimentar e da massa corporal

A ingestão alimentar foi monitorada diariamente entre 8h00min e 9h00min e o peso corporal verificado três vezes na semana, às segundas, quartas e sextas-feiras entre 8h00min e 10h00min.

3.6. Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação 48h após a última sessão de treinamento. O músculo gastrocnêmio branco, foi separado, pesado e imediatamente congelado no nitrogênio líquido e armazenado a -80° C até o momento das análises.

3.7. Expressão Gênica

3.7.1. Extração e controle de qualidade de RNA total

Amostras de 100mg de cada tecido foram homogenizadas com o Power Gen1000 (Fisher Scientific®) em 1000 μ l TRIZOL (Invitrogen®, Carlsbad,

California), 3 vezes de 30 segundos. Depois de descansar 5 minutos, era feita a separação com 200 μ l de clorofórmio e centrifugado. Seguiu-se pela fase de precipitação adicionando 450 μ l de Isopropanol, centrifugando logo após, descartando o sobrenadante e fazendo a lavagem.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (260nm) e verificado seu grau de pureza (260nm/280nm), utilizando o equipamento Nanodrop. Todas as amostras utilizadas tiveram a razão 260nm/280nm acima de 1,8. A integridade do RNA foi visualizada com brometo de etídeo por eletroforese em gel de agarose (MASEK et al., 2005).

A figura 2, mostra um gel de agarose com as bandas visualizadas através da eletroforese.

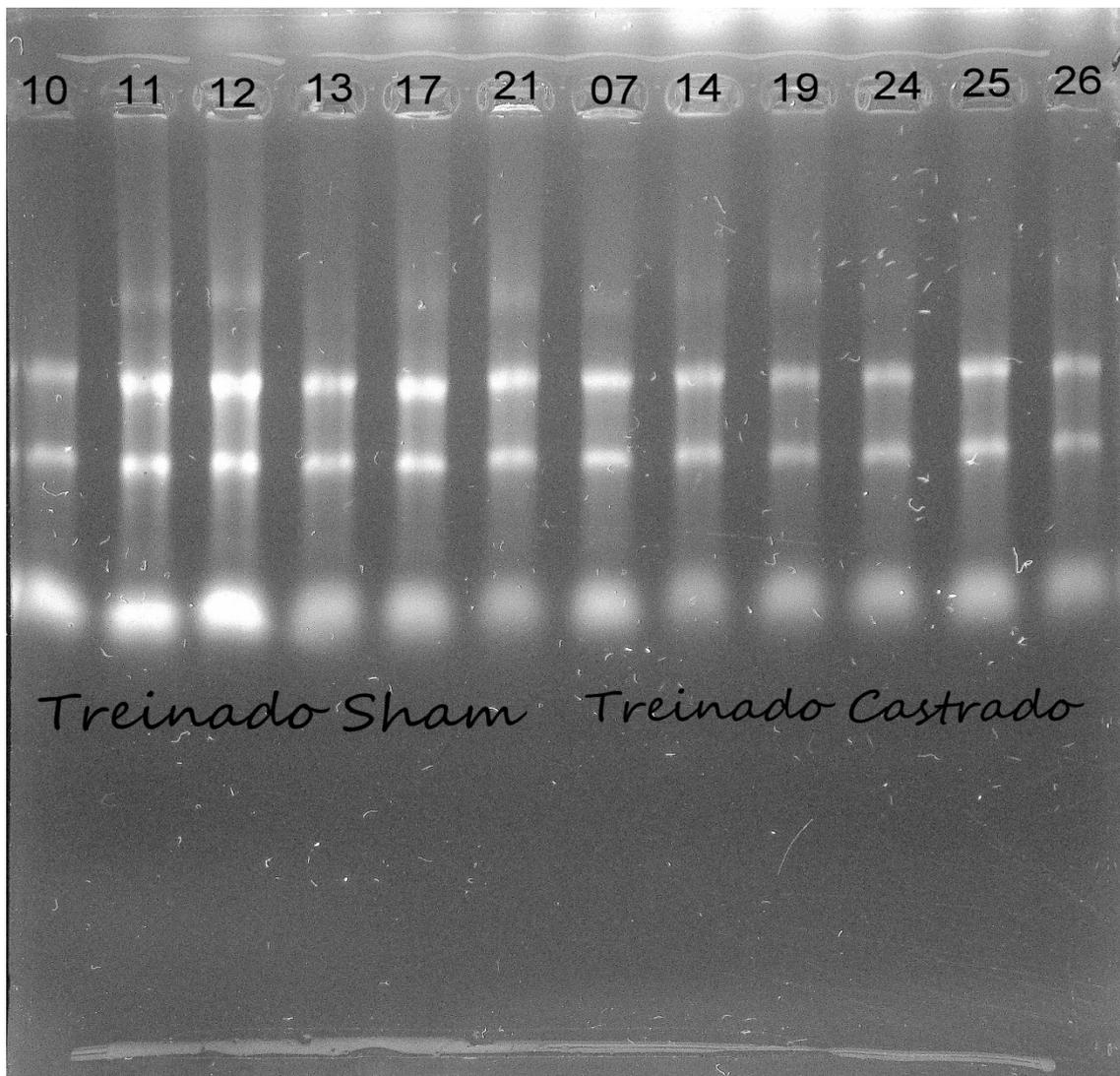


Figura 5: gel de agarose.

3.7.2. Transcrição reversa

A primeira fita do cDNA foi sintetizada por transcrição reversa de 1 µg de RNA, usando Oligo(dT) e M-MLV Reverse Transcriptase (Promega[®], Madison, WI) de acordo com o manual do fabricante.

3.7.3. PCR em tempo real

A quantificação do RNAm da Mstn, da Fstn e da β-Actina de todos os tecidos foi realizada em duplicata no termociclador Rotor Gene 3000 Centrifugal Real-Time (Corbett Research[®], Mortlake, Austrália). O gene β-Actina foi usado como controle uma vez que foi previamente demonstrado que não varia com o exercício resistido (JEMIOLO; TRAPPE, 2004). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para cada gene foi realizada com o reagente SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], Fosters City, CA), *primers forward e reverse* (Tabela 1), água livre de Dnase e o cDNA, em um volume final de reação de 25 µl.

Os parâmetros utilizados para a reação de PCR foram: desnaturação inicial em 95° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos na temperatura de anelamento específica de cada primer e 60 segundos a 72 °C. Um único pico de *melting* foi observado para cada amostra, validando que apenas um produto estava presente (Aoki et al., 2009) e o tamanho dos amplicons formados foram verificados em gel de agarose 1%. O controle negativo foi feito através da reação de PCR sem cDNA.

Tabela 1. Sequência dos primers

RNAm alvo	Forward	Reverse
Mstn	GAGGGATGACAGCAGTGATGGCTCTTTGG	CGGTCTACTACCATGGCTGGAATTTTCCC
Fstn	AGGGAAAGTGTATCAAAGCAAAGTC	AACCTTGAAATCCCATAGGCATT
Beta-Actina	TCAGGTCATCACTATCGGCAATG	TTTCATGGATGCCACAGGATTC

Mstn, Miostatina; Fstn, Folistatina, Beta-Actina.

As temperaturas de anelamento (T_m) dos primers foram previamente padronizadas. Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (figura 6).

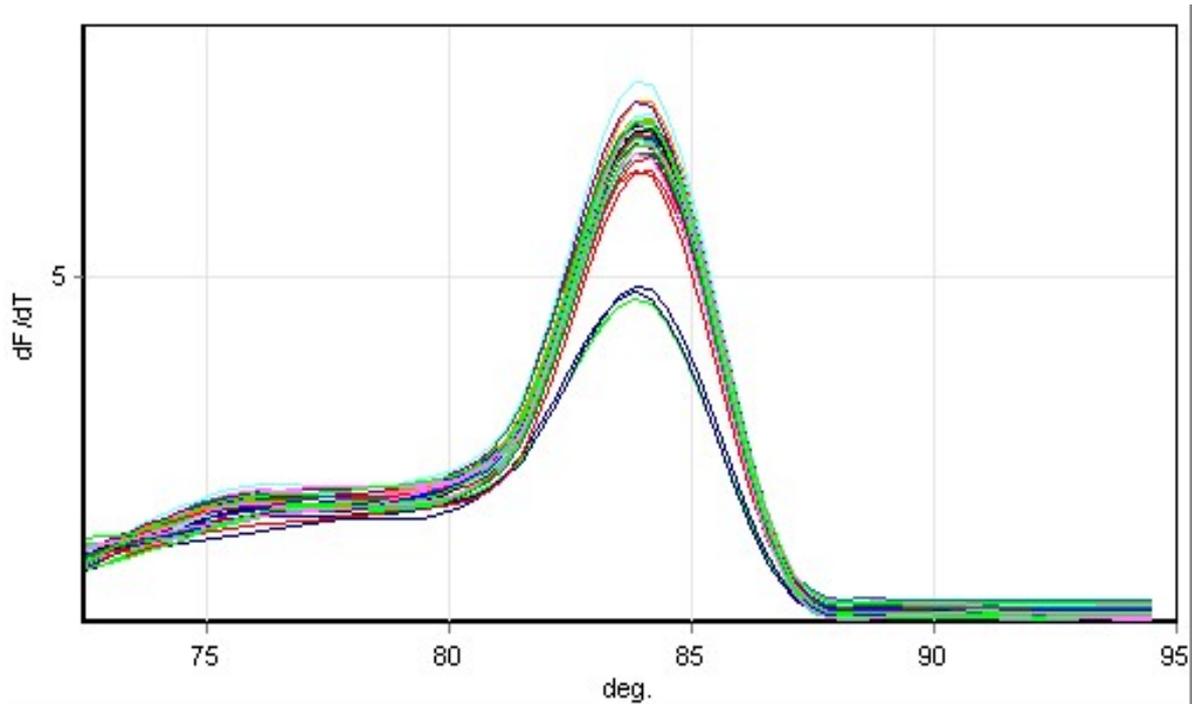


Figura 6: Curva de MELT da Mstn

Os valores de Ct (Threshold cycle) e as curvas de melt foram fornecidos pelo *Software Rotor Gene – 6*. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (figura 8).

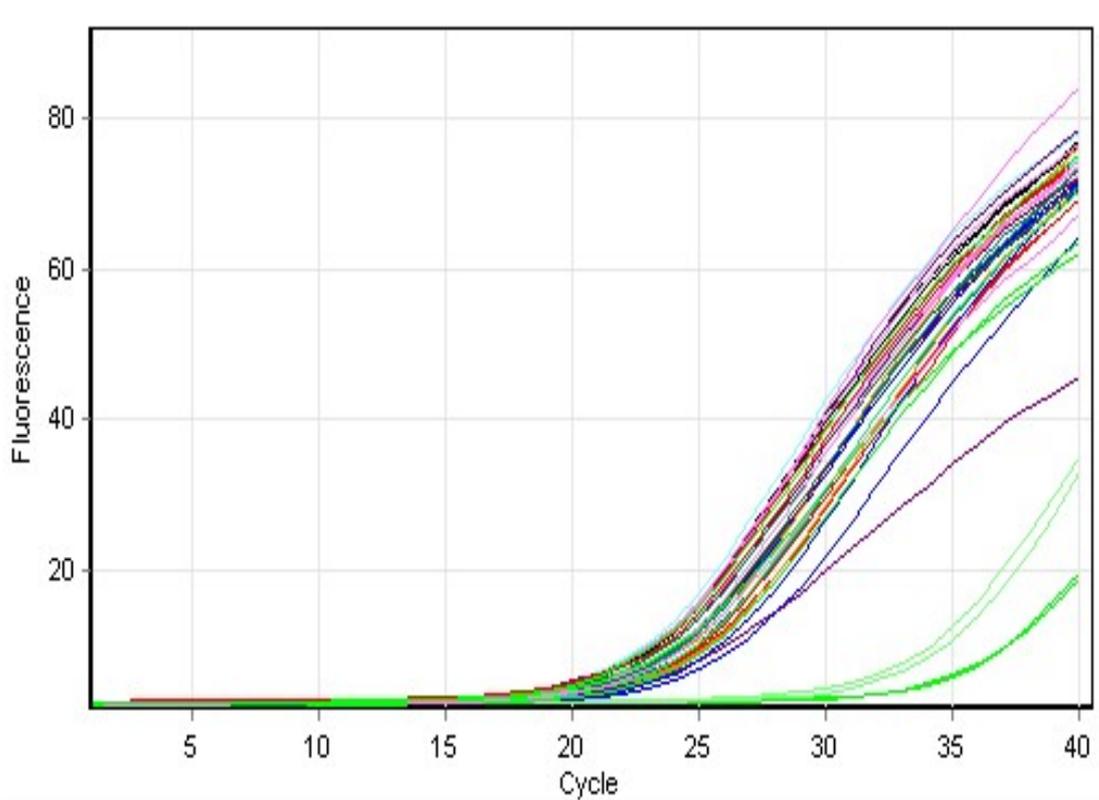


Figura 7: Curva de amplificação do qRT-PCR

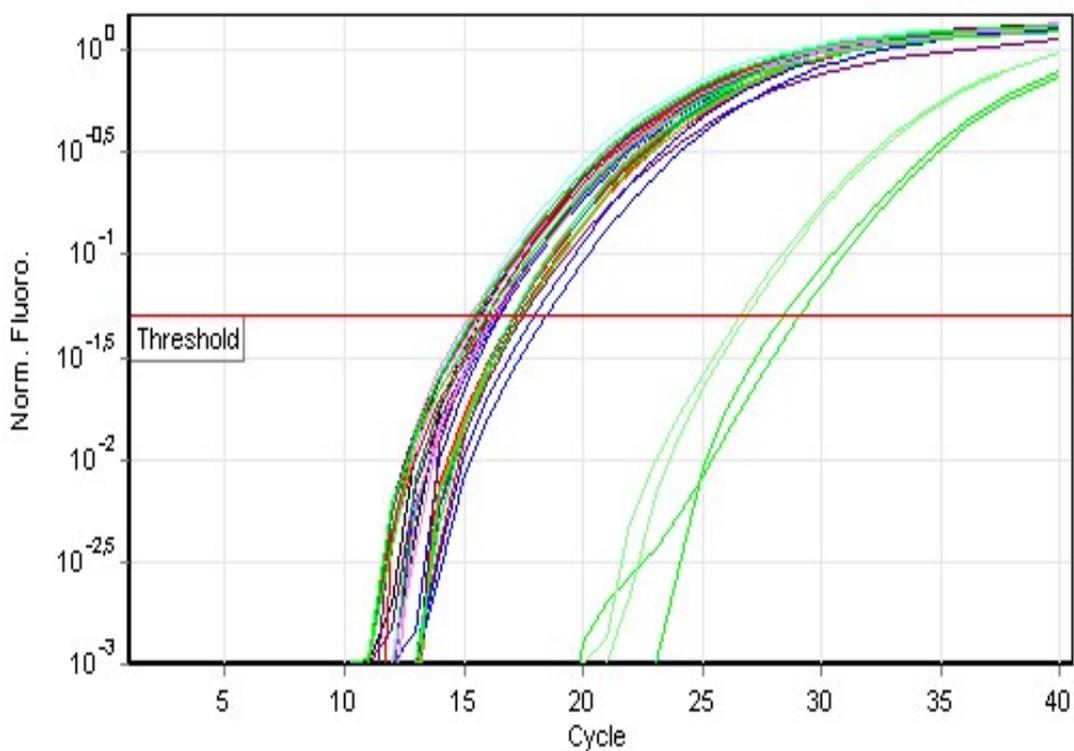


Figura 8: Curva de amplificação do qRT-PCR com o limiar de amplificação demonstrado (C_t), de 0,05.

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de $\Delta\Delta Ct$. Depois de calculado a média dos Ct de cada gene (Beta Actina, Mstn, Fstn) foi realizado:

- ΔCt (delta Ct) = Ct MSTN – Ct Beta-Actina ou Ct Fstn - Ct Beta-Actina, seguindo:
- Cálculo da média S: Média do ΔCt , seguindo:
- $\Delta\Delta CT$ (delta delta CT): ΔCT - média S

Os $\Delta\Delta CT$ dos grupos sedentário intacto, sedentário sham, sedentário castrado, treinado intacto, treinado sham e treinado castrado foram calculados em relação ao grupo sedentário intacto. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da Mstn e Fstn foi calculado por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Com os valores em Unidades Arbitrárias (UA) foram utilizados os testes estatísticos.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são expressos em média \pm erro padrão da média, em unidades arbitrárias. Para análise estatística foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov; análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Tukey. O programa estatístico utilizado foi o OriginPro8[®] adotando nível de significância de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Ao final da última sessão de treino, houve diferença significativa entre o peso total dos animais TC e SI, demonstrado na figura 9. Não houve diferença entre os grupos nas demais sessões de treino, assim como não houve diferença da ingestão alimentar (dados não mostrados), como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Evolução do peso corporal dos ratos durante o período experimental (8 semanas):

Tempos	Média/grupos	SI	SS	SC	TI	TS	TC
Início	Media	184	183,1	183,3	185	184,6	186,3
	DP	7,3	6,6	9,5	5,6	7,3	6,4
Pré castração	Media	229,8	226,3	230,4	236,0	229,1	224,1
	DP	13,8	9,6	15,9	11,4	14,4	13,6
Pré-treino	Media	374,5	356,9	358,7	372,5	357,7	368,1
	DP	36,3	47,9	23,1	44,9	39,7	26,0
Pós-treino	Media	640,3	591,3	565,5	619,0	601,7	541,2 *
	DP	21,4	76,9	40,7	71,2	41,8	38,5

*P < 0,05, TC vs SI.

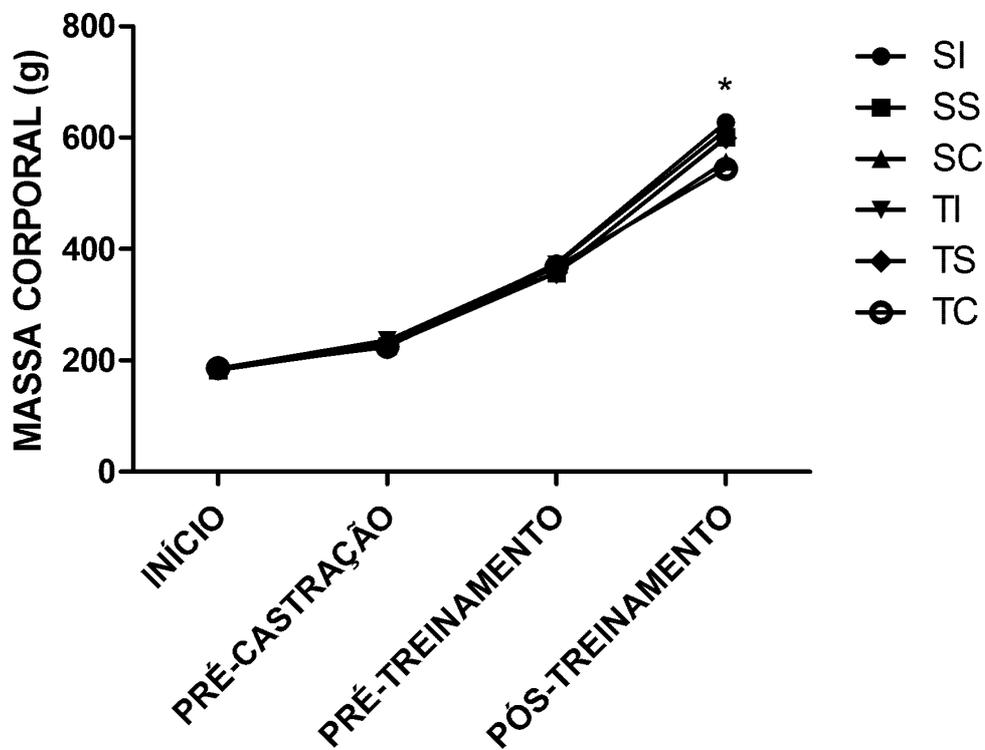


Figura 9: Massa corporal dos animais (média \pm EPM). * P < 0,05. SI vs TC.

Houve diferença estatística na expressão da Mstn com aumento da expressão gênica da Mstn do grupo SC em relação ao SI. Porém, não houve diferença estatística dos animais dos grupos TI, TS e TC. Também não houve diferença dos grupos treinados para os animais dos grupos sedentários, como pode ser observado na figura 10.

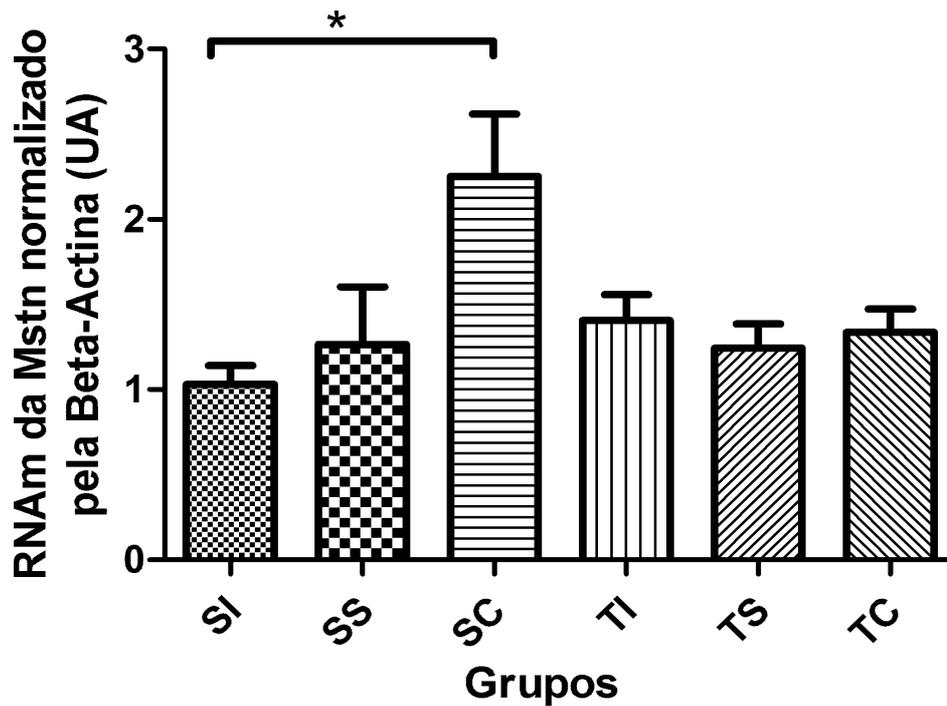


Figura 10: Expressão do RNAm da Miostatina (Mstn). * $P < 0,05$. SC vs SI.

Quanto a Fstn, houve diminuição da expressão da Fstn nos grupos TS e TC, sendo diferentes significativamente de SI e TI. A diferença encontrada, pode ser observada na figura 11, que demonstra a diferença da Fstn entre os grupos TC e SI, TC e TI, e também entre os grupos TS e SI e TS e TI.

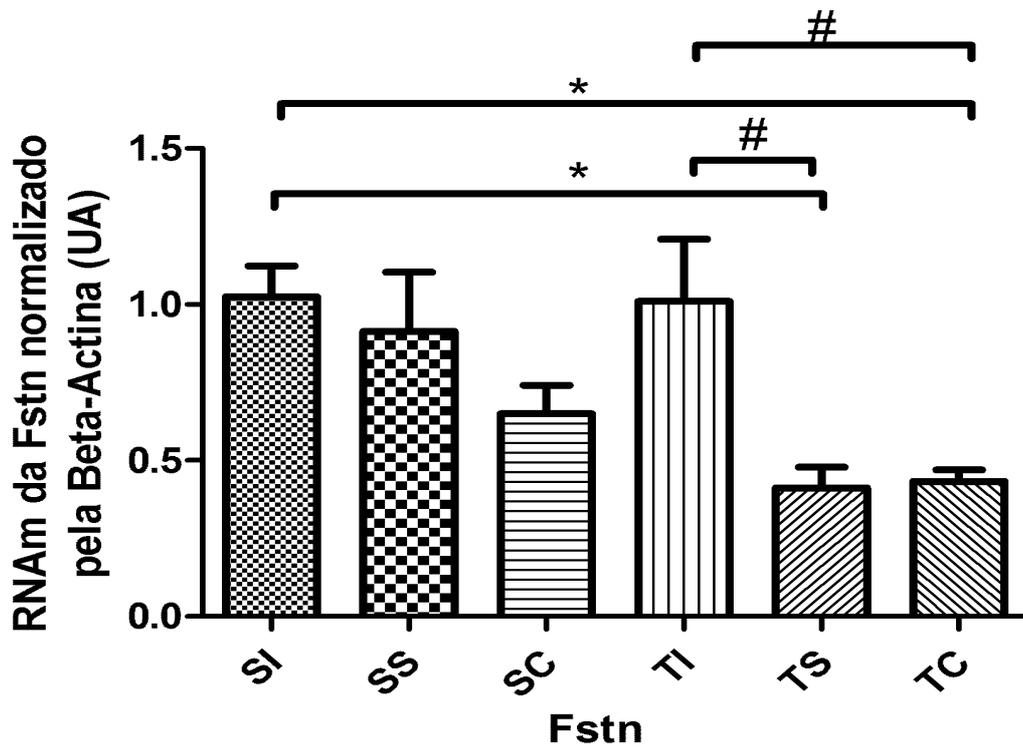


Figura 11: Expressão do RNAm da Folistatina (Fstn). $P < 0,05$, * TS vs SI e TC vs SI e # TS vs TI, e TC vs TI.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente hipotetizamos que a castração aumentaria a expressão gênica da Mstn. Os resultados confirmaram esta hipótese, pois o grupo SC obteve um aumento significativo da expressão gênica da Mstn em relação ao SI. Este é um resultado original, sendo o primeiro a demonstrar este efeito da castração sobre a expressão da Mstn. Não encontramos muitos trabalhos relacionando a castração com a expressão gênica da Mstn. Nos trabalhos encontrados, não tiveram diferença estatística da castração, porém estes trabalhos não tiveram um tempo prolongado em exposição a castração.

Mendler et al. 2007, avaliou a expressão da Mstn após 7, 11 e 14 dias de castração em ratos pré-púberes, com e sem tratamento de testosterona. Após os 14 dias de castração, não houve diferença estatística em comparação com o grupo controle da expressão da Mstn, sendo que este foi o tempo de maior atrofia do músculo levantador do ânus encontrado neste estudo. No presente estudo, os animais submetidos a castração ficaram expostos aos efeitos da ausência de androgênios por 9 semanas, tendo uma maior exposição aos efeitos da ausência da testosterona e assim um aumento mais significativo da expressão do RNAm da Mstn, nos ratos castrados, do que Mendler et. al, 2007. No entanto, Mendler et. al, 2007, fizeram a avaliação da quantidade proteica da Mstn e verificaram um grande aumento, tanto da quantidade da pró-poteína, quanto da forma ativa da Mstn, em relação ao grupo controle.

O resultado obtido no presente estudo indica que a ausência da testosterona influencia a expressão gênica da Mstn, aumentando sua expressão gênica da Mstn e exercendo um papel importante na regulação da hipertrofia e ciclo celular, processos que estão sendo inibidos pela Mstn, e provavelmente a falta deste hormônio androgênio pode contribuir com o processo atrófico e sua consequente perda de massa muscular.

A nossa segunda hipótese foi que o treinamento resistido provocaria uma diminuição da expressão do RNAm da Mstn, e isto não pode ser confirmado, como pode ser visto na figura 10, pois não houve diferença significativa dos grupos treinados em relação ao SI. Este resultado difere de resultados encontrados na literatura que mostram diminuição da expressão da Mstn após treinamento de força

feito em humanos (Ryan et. al., 2010; Kim et. al., 2007; Mascher et al., 2007; Roth et al, 2003). Porém estes trabalhos não podem ser totalmente comparados com o presente estudo que fora realizado com ratos. Ainda são necessários mais estudos com relação ao assunto.

Nossos resultados confirmam os resultados obtidos por Schiffer et al, 2011; Hulmi et al, 2009; Kvorning et. al., 2007; Adams et. al., 2007; e Kim et al, 2007, em que o treinamento resistido foi incapaz de promover a diminuição da expressão da Mstn. Porém, destes trabalhos, apenas Adams et. al., 2007, fizeram trabalho com ratos como o presente estudo.

Segundo Hulmi et al, 2009, após 1 h da sessão de treino há uma diminuição da expressão da Mstn, e 48h após treinamento encontra-se níveis aumentados da expressão da Mstn. Isto pode ter ocorrido pelo fato da mTOR estar ativa após a execução do exercício resistido sendo ativada pelo próprio exercício em via de sinalização independente de qualquer outro sinalizador, causando assim uma diminuição da expressão gênica da Mstn logo após o exercício (Mascher et al., 2007). Esta observação foi feita através da coleta de vários outros genes relacionados a hipertrofia, e entre eles, a expressão da mTOR que aumentou, mostrando que o exercício resistido é um instrumento capaz de alterar a expressão de moléculas-chaves da hipertrofia e regula a expressão gênica da Mstn. No entanto, o trabalho de Mascher et. al, 2007 não avaliou medidas após 48h da última sessão de treino.

No presente estudo, os animais foram sacrificados 48h após a última sessão de treino, não sendo possível avaliar se após 1h da última sessão de treino e avaliar a consequente diminuição da expressão da Mstn pela ativação da mTOR, como apontado no trabalho realizado por Hulmi et al., 2009.

Uma limitação de nosso estudo, foi que não avaliamos a expressão de moléculas-chave para a hipertrofia celular, como mTOR e AKT. No entanto, a literatura possui vastas referências sobre o assunto.

Uma possibilidade para não termos obtido diferença da expressão da Mstn entre os grupos treinados e sedentários é que o treinamento de força proposto pelo nosso estudo, tenha sido muito estressante para o animal, levando à síntese e secreção de glicocorticóides, que possuem um efeito atrófico, e influenciam a expressão gênica da Mstn. Segundo Ma et al, 2003, a aplicação de dexametasona

em ratos, aumenta a expressão gênica e quantidade proteica da Mstn, e quando aplicado um antagonista do receptor da dexametasona, não há aumento da Mstn, indicando assim a influência da dexametasona sobre a Mstn e sua contribuição para o processo atrófico do músculo esquelético.

A expressão do RNAm da Fstn, nos grupos TS e TC em relação aos grupos SI e TI foi significativamente menor. Nosso resultado difere dos resultados obtidos por Diel et al., 2010; e Jency et al., 2007, que não encontraram esta diferença. Hipotetizamos que o treinamento resistido fosse aumentar a expressão gênica da Fstn, porém isto não ocorreu. Hormônios anabólicos como o Hormônio do Crescimento (GH), Insulina e outras proteínas como o IGF-1 podem ter influenciado os resultados obtidos da Fstn no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

O treinamento de força não foi capaz de inibir ou diminuir a expressão da Mstn no músculo Gastrocnêmio Branco dos ratos deste estudo, porém, pode ter influenciado a regulação da expressão do RNAm da Fstn nos grupos TS e TC. Concluimos também que a castração promove aumento da expressão de Mstn, promove uma tendência de queda, observada em SC e uma queda significativa em relação ao TI e SI, quando adicionado o treinamento resistido. Não houve uma relação inversa entre a expressão de Mstn e Fstn, pois há outros agentes anabólicos que podem modular a Mstn, mesmo com a falta da Testosterona.

Concluimos também, que a castração influencia o peso corporal de ratos treinados e são necessários mais estudos para esclarecer estes questionamentos, e também entendermos melhor a via de sinalização da Mstn.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

McPherron, A. C.; Lawer, A. M.; Lee, S., Regulation of Skeletal muscle mass in mice by TGF- β superfamily member. **Nature**, Vol. 387, Mai, 83-90, 1997.

Zimmers, T. A. et al., Induction of Cachexia in mice by systemacally administered myostatin. **Science**, Vol. 296, Maio, 1486-1488, 2002.

Lee, S.; McPherron, A. C., Regulation of Myostatin activity and muscle growth. **PNAS**, Vol.98, 16, Mai, 9306-9311, 2001.

Matsakas, A. et al., Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of Myostatin m RNA content in the rat. *Acta Physiol Scand*, 183, 299–307, 2005.

Kovacheva, E. L. et al., Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of Myostatin, c-Jun NH₂-terminal kinase, notch, and Akt signaling pathways. **Endocrinology**, 151: 628–638, 2010.

Kocamis, K.; Killefer, J.; Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domestic Animal Endocrinology** 23, 447–454, 2002.

Amthor, H. et al., Muscle hipertrophy driven by Myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. **PNAS**, Vol. 106, Mai, 18, 7479-7484, 2009.

Walsh, F. S.; Celeste, A. J., Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells, **Biochemical Society Transactions**, Vol. 33, 1513-1517, 2005.

Amirouche, A. et al., Down-Regulation of Akt/Mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. **Endocrinology**, Jan, Vol. 150, 1, 286–294, 2009.

Sakuma, K.; Yamaguchi, A.; Molecular Mechanisms in Aging and Current Strategies to Counteract Sarcopenia. **CAS**, Vol. 3, n 2, 1-12, 2010.

Ji, M. et al., Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway. **Cellular Signalling**, Vol. 20, 1452–1458, 2008.

Kolias, H. D.; Mcdermott, J. C., Transforming growth factor- β and Myostatin signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 104: 579–587, 2008.

Aoki, M. S. et al., Expression of genes related to Myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle & Nerve**, 40: 992–999, 2009.

Rodino-Kaplan, L. R. et al., Inhibition of Myostatin with emphasis on Follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle Nerve**, March, Vol. 39 (3): 283–296, 2009.

Mcfarlane, C. et al., Myostatin signal through Pax7 to regulate satellite cells self-renewal. **Experimental Cell Research**, Vol. 314, 317 – 329, 2008.

Thomas, M et al. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 40235 - 40243, 2000.

Gilson, H. et al., Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both Myostatin and Activin. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 297: 157-164, 2009.

Haidet, A. M. et al, Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of Myostatin inhibitors. **PNAS**, Março, Vol. 115, 11: 4318-4322, 2008.

Nakatani, M. et al, Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2011.

Welle, S.; Burgess, K.; Mehta, S., Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, P70S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of Myostatin in mature mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 296: E567–E572, 2009.

Jones, T. E.; Knight, K. R.; Sarcopenia – Mechanisms and Treatments. **Journal of Geriatric Physical Therapy** Vol. 32, 2, 39-45, 2009.

Bhasin, S. et al., The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. **NEJM**, Vol. 335, p 1-7, 1996.

Bhasin, S. et al., Testosterone dose-response relationships in healthy young men, **Am J Physiol Endocrinol Metab** 281: E1172–E1181, 2001.

Sinha-Hikim, I. et al., Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy, **Am J Physiol Endocrinol Metab** 283: E154–E164, 2002.

Schroeder, E. T. et al., Effects of an oral androgen on muscle and metabolism in older, community-dwelling men, **Am J Physiol Endocrinol Metab** 284: E120–E128, 2003.

Singh, R. et al., Regulation of Myogenic Differentiation by Androgens: Cross Talk between Androgen Receptor/ β -Catenin and Follistatin/Transforming Growth Factor- β Signaling Pathways, **Endocrinology**. 2009 March; 150(3): 1259–1268.

Morissette, M. R. et al., A., Effects of Myostatin deletion in aging mice. **Aging Cell**, Setembro, 8, 5: 573–583, 2009.

Kim, J.; Cross, J. M.; Bamam, M. M., Impact of resistance loading on Myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 288: E1110–E1119, 2005.

Position Stand, Exercise and Physical Activity for Older Adults. **American College of Sports Medicine**, 2009.

Hornenberg, T. A. Jr.; Farrar, R. P., Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat, **Can. J. Appl. Physiol.** 29(1): 16-31, 2004.

Domingos, M. M. et al., Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. **Eur J Appl Physiol**, Aug 10 2011.

Leite, R.D. et al., Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009.

Mendler, L. et al., Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle, **Biochemical and Biophysical Research Communications** 361 (2007) 237–242.

Ryan, A. S. et al., Skeletal Muscle Hypertrophy and Muscle Myostatin Reduction after Resistive Training in stroke survivors. **Journal of American Heart Association**, Setembro, 2010.

Mascher, H. et al., Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 294: E43–E51, 2008.

Roth, S. M. et al., Myostatin Gene Expression Is Reduced in Humans with Heavy-Resistance Strength Training: A Brief Communication. **Exp Biol Med**, 228: 706–709, 2003.

Schiffer, T. et al., Myostatin mRNA after varying exercise modalities in humans. **Int J Sports Med**, 32: 683– 687, 2011.

Hulmi, J. J. et al., Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. **J Appl Physiol** 106: 1720–1729, 2009.

Kvorning, T. et al., Suppression of testosterone does not blunt mRNA expression of myoD, myogenin, IGF, myostatin or androgen receptor post strength training in humans, **J Physiol** 578.2 pp 579–593 (2007).

Adams, G. R. et al., Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. **J Appl Physiol** 103: 1644–1654, 2007.

Kim, J.; et al., Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis. **J Appl Physiol** 103: 1488–1495, 2007.

Ma, K. et al., Characterization of 59-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 281: E1128–E1136, 2001.

Diel, P. et al., Analysis of the effects of androgens and training on myostatin propeptide and follistatin concentrations in blood and skeletal muscle using highly sensitive Immuno PCR. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Dezembro, Vol. 330, 1, 1-9, 2010.

Jensky, N. E. et al., Exercise Does Not Influence Myostatin and Follistatin mRNA expression in Young Women. **J Strength Cond Res**. 2010 February ; 24(2): 522.

Goto, K. et al., MUSCULAR ADAPTATIONS TO COMBINATIONS OF HIGH- AND LOW-INTENSITY RESISTANCE EXERCISES. **Journal of Strength and Conditioning Research**. 2004, 18(4). 730-737.

Barstow, I. K.; Bishop, M. D.; Kaminski, T. W., Is Enhanced-Eccentric Resistance Training Superior To Tradicional Training For Increasing Elbow Flexor Strength? **Journal of Sports Science and Medicine** (2003) 2, 62-69.

Kramer, W. J.; Ratamés, N. A.; Fundamentals of Resistance Training: Progression and Exercise Prescription, **Med. Sci. Sports Exerc.**, Vol. 36, No. 4, pp. 674-688, 2004.

Garma, T. et al., Similar acute molecular responses to equivalent volumes of isometric, lengthening, or shortening mode resistance exercise, **J Appl Physiol** 102: 135–143, 2007.