

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

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO ASSOCIADO COM DECANOATO DE  
NANDROLONA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MODULADORES DE VIAS  
DE HIPERTROFIA E ATROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Uliana Sbeguen Stotzer

SÃO CARLOS  
2009

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

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO ASSOCIADO COM DECANOATO DE  
NANDROLONA SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MODULADORES DE VIAS  
DE HIPERTROFIA E ATROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Uliana Sbeguen Stotzer

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Departamento de 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.  
(Linha de pesquisa: Biologia molecular do exercício)

SÃO CARLOS  
2009

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

S888et

Stotzer, Uliana Sbeguen.

Efeitos do treinamento resistido associado com decanoato de nandrolona sobre a expressão gênica de moduladores de vias de hipertrofia e atrofia do músculo esquelético / Uliana Sbeguen Stotzer. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
51 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia do exercício físico. 2. Esteróides anabólicos.  
3. Ciclo celular. 4. Músculo gatrocnêmio. I. Título.

CDD: 612.04 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Uliana Sbeguen Stotzer

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

*Heloisa Selistre*

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

*Tania de Fátima Salvini*

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes.....

*Fernanda Klein Marcondes*

# DEDICATÓRIA

Às minhas filhas, Ana Júlia e Ana Beatriz, por me (re)-ensinarem a cada instante o amor, a paciência, o perdão, a companhia e a beleza e alegria das coisas simples, simplesmente....

## RESUMO

O uso de esteróides anabólicos androgênicos (EAA) é disseminado entre atletas e não atletas que desejam melhorar o desempenho ou a aparência física. Os EAA agem sobre as células satélites no músculo esquelético, que são as principais precursoras do músculo esquelético, sendo essenciais tanto para crescimento quanto para reparo muscular. Quando são ativadas, na presença de diversos fatores, incluindo o fator D de diferenciação miogênica (MyoD), elas podem se proliferar e diferenciar-se em novas miofibrilas ou mionúcleos, resultando em maior síntese proteica. Por outro lado, a miostatina é capaz de inibir essa progressão do ciclo celular. Uma maior expressão de ubiquitinas de ligação, Atrogina-1 e *muscle ring finger protein 1* (MuRF-1), resulta em aumentada degradação muscular. Entender os mecanismos de ação dos EAA no músculo esquelético é essencial para uma melhor compreensão da fisiologia muscular sob a ação dos EAA. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do treinamento pliométrico aquático com sobrecarga associado a doses supra-fisiológicas de EAA sobre a expressão de moduladores de vias de hipertrofia e atrofia do músculo esquelético. Ratos Wistar foram agrupados em não treinados (S), treinados (T), S tratados com EAA (E), e T tratados com EAA (TE). Os grupos que treinaram realizaram saltos na água: quatro séries de 10 saltos com 30 segundos de intervalo entre as séries, 5 vezes por semana durante 7 semanas, com uma sobrecarga progressiva de 50 a 80% do peso corporal. Decanoato de nandrolona (5 mg/kg) foi injetado subcutaneamente duas vezes por semana. Imediatamente após a última sessão os animais foram mortos. A expressão gênica de miostatina, MyoD, Atrogina-1 e MuRF-1 do músculo gastrocnêmio foi determinada por transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. O treinamento não alterou a expressão de nenhum dos genes estudados, enquanto sua associação com o EAA aumentou a expressão gênica de atrogina-1 e reduziu de miostatina. A expressão de MyoD e MuRF-1 não foi alterada pelo EAA. Os resultados mostraram que tanto a miostatina quanto a atrogina-1, importantes genes relacionados tanto a progressão do ciclo celular quanto a degradação de proteínas no músculo esquelético, são sensíveis ao EAA.

**Palavras chave:** Treinamento pliométrico Aquático; Esteróide Anabólico Androgênico, Miostatina; MyoD; Atrogina-1; MuRF-1.

## ABSTRACT

Androgenic-anabolic steroids (AAS) are spread among athletes and non-athletes in order to improve performance or physical appearance. AAS targets the satellite cells in skeletal muscles, which are the major precursors of the skeletal muscle, and are essential for muscle growth and repair. When activated, in the presence of several factors, including myogenic differentiation factor D (MyoD), they proliferate and differentiate into new myofibers or myonuclei, resulting in increased protein synthesis. On the other hand, myostatin is able to inhibit cell cycle progression. Up-regulation of the expression of ubiquitin ligases, Atrogin-1 and muscle ring finger protein 1 (MuRF-1), results in increased muscle degradation. The understanding of AAS mechanism of action in skeletal muscle is critical for a better comprehension of muscular physiology under AAS use and abuse. The aim of this study was to investigate the effects of resistance training associated to AAS supraphysiological dose on the expression of modulators of skeletal muscle pathways of atrophy and hypertrophy. Wistar rats were grouped into: sedentary (S); trained (T); S with AAS (A); and T with AAS (TA). Exercised groups performed jumps in water: 4 sets of 10 jumps each and 30-second of rest interval between series, for 7 weeks with a progressive overload of 50 to 80% of body weight. Nandrolone decanoate (5 mg/kg) was injected sc twice a week. After last exercise session animals were killed. Myostatin, MyoD, Atrogin-1 and MuRF mRNA expression were determined in the gastrocnemius muscle extracts by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The exercise did not change RNA expression of any studied genes while AAS or its association with training increased atrogin-1 and reduced myostatin RNA expression. The expression of MyoD and MuRF-1 was not altered by AAS. These results showed that both myostatin and atrogin-1, important genes of skeletal muscle related to cell cycle progression and protein degradation, are sensitive to supraphysiological doses of AAS.

**Key words:** aquatic plyometric training; Androgenic-anabolic Steroids; Myostatin; MyoD; Atrogin-1; MuRF-1

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química e mecanismo de ação da testosterona.....	5
FIGURA 2. Corte transversal de um músculo esquelético e suas.....	11
FIGURA 3. Organização do músculo esquelético.....	12
FIGURA 4. Localização da célula satélite vista em corte transversal do músculo esquelético.....	14
FIGURA 5. Supostos elementos da via metabólica da miostatina.....	18
FIGURA 6. A função proposta da miostatina durante o crescimento e diferenciação muscular.....	19
FIGURA 7. Estrutura da proteína miostatina e as mutações naturais que ocorrem no gene da miostatina em bovinos.....	20
FIGURA 8. Esquema da degradação de uma proteína via sistema ubiquitina proteassomo.....	22
FIGURA 9. A via AKT/FOXO.....	24
FIGURA 10. Demonstração do colete usado no treino dos animais.....	29
FIGURA 11. Animal saltando e depois sendo retirado da água, finalizando a sessão de treinamento.....	30
FIGURA 12. Nível de expressão do RNAm da miostatina no músculo gastrocnêmio...	35
FIGURA 13. Nível de expressão do RNAm da MyoD no músculo gastrocnêmio.....	35
FIGURA 14. Nível de expressão do RNAm da Atrogina-1 no músculo gastrocnêmio..	36
FIGURA 15. Nível de expressão do RNAm do MuRF-1 no músculo gastrocnêmio.....	36
FIGURA 16. Possíveis interações entre os EAA e MyoD, Miostatina, Atrogina-1 e MURF-1.....	41

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. Principais efeitos adversos dos EAA.....	10
TABELA 2. Informações sobre sequências de primers e amplicons.....	32
TABELA 3. Variação do peso muscular normalizado para o peso corporal final entre os diferentes grupos.....	34

.

# LISTA DE ABREVIATURAS

1ª parte: definições em português

(NF)- $\kappa\beta$	Fator Nuclear Kappa $\beta$
ACMS	Colégio Americano de Medicina Esportiva
ATR	Atrofia
DHT	Dihidrotestosterona
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
E1	Enzima de Ativação da Ubiquitina
E2	Enzima de Conjugação da Ubiquitina
E3	Enzima de Ligação da Ubiquitina
EAA	Esteróides Anabólicos Androgênicos
FRM	Fatores Regulatórios Miogênico
GDF-8	Fator de Crescimento e Diferenciação 8
MEC	Matriz Extracelular
MRF4	Fator Regulatório Miogênico 4
MST	Miostatina
Myf5	Fator Miogênico 5
MyoD	Fator D de diferenciação miogênica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKB	Proteína Kinase B
RT	Transcrição reversa
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante $\beta$
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-Alpha
TR	Treinamento Resistido

*2ª parte: definições em Inglês (termos ainda não traduzidos para o português)*

FOXO	Forkhead transcription Factor
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MuRF-1	Muscle RING Finger Protein 1
SCFs	Skp 1, Cullin, F-box

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1.	<i>Esteróides Anabólicos Androgênicos .....</i>	4
2.1.1.	História no mundo do esporte.....	4
2.1.2.	O que são .....	5
2.1.3.	Função .....	6
2.1.4.	Ação no músculo esquelético .....	8
2.1.5.	Interação no esporte: efeitos deletério-adversos.....	9
2.2.	<i>Sistema Músculo-Esquelético.....</i>	10
2.2.1.	Estrutura .....	10
2.2.2.	Função .....	12
2.2.3.	Células Satélites.....	14
2.2.4.	MyoD.....	16
2.2.5.	Miostatina .....	16
2.2.6.	Atrogina-1 e Murf-1 .....	21
2.2.7.	O modelo de treinamento em salto .....	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1.	<i>Grupos Experimentais.....</i>	28
4.2.	<i>Tratamento com EAA .....</i>	29
4.3.	<i>Protocolo de treinamento .....</i>	29
4.4.	<i>Sacrifício dos animais e retirada do músculo .....</i>	30
4.5.	<i>Extração e controle de qualidade de RNA total.....</i>	31
4.6.	<i>Transcrição reversa.....</i>	31
4.7.	<i>PCR em tempo real.....</i>	31

4.8.	<i>Análise Estatística</i> .....	33
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	34
6.	<b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	37
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	43
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

# 1. INTRODUÇÃO

A atividade física vem ganhando cada dia mais espaço na vida das pessoas que buscam melhora na qualidade de vida (BROOKS, 2003). Porém, também existem pessoas que procuram a atividade física para melhorar a estética corporal ou a performance esportiva e desejando atingir o mais rápido possível seus objetivos acabam associando a atividade física a doses suprafisiológicas de esteróides anabólicos androgênicos (EAA). O uso dessas substâncias aumenta a cada dia e o benefício médico de pequenas doses perdeu espaço para as doses excessivas cada vez mais auto-administradas e prescritas para atletas de elite, levantadores de peso ou pessoas que simplesmente buscam uma melhor aparência física (CLARK;HENDERSON, 2003).

Apesar dos EAA serem benéficos em determinadas condições patológicas, por exemplo, reduzindo os danos musculares pós-cirúrgico (TAMAKI et al., 2009) ou a atrofia provocada por deservação (ZHAO et al., 2008), estudos em ratos saudáveis mostrou que o uso de EAA não promove hipertrofia (CUNHA et al., 2006; TAMAKI et al., 2009). Além disso, os EAA promovem uma série de efeitos deletérios, como depressão, agressividade (TALIH; FATTAL;MALONE, 2007) derrame cerebral (SAHRAIAN et al., 2004), supressão dos esteróides gonadais (KICMAN, 2008), entre outros.

Apesar dos efeitos deletérios, o uso dos EAA é amplo entre pessoas que acreditam que eles promovam aumento da massa muscular e da performance, sustentem períodos de treino intensivo, diminua a massa gorda e melhore a aparência (ESTRADA; VARSHNEY;EHRlich, 2006; KICMAN, 2008), mas sua eficácia, em relação a melhoria da função física e qualidade de vida, ainda precisa de ser demonstrada (KICMAN, 2008).

Alguns mecanismos moleculares envolvidos na ação dos EAA permanecem pouco compreendidos (KICMAN, 2008). Acredita-se que os EAA tenham ação direta sobre células satélites, porque elas expressam receptores de andrógenos (CHEN; ZAJAC;MACLEAN, 2005; KADI, 2008). A administração de EAA pode aumentar o número de células satélites, tanto em ratos quanto em humanos (MCCLUNG et al., 2005)

Células satélites são células quiescentes que, quando ativadas, podem se proliferar e se diferenciar em novos mionúcleos ou novos miotubos que irão se unir às miofibrilas já existentes (KADI, 2008). O fator D de diferenciação miogênica (MyoD) é um dos fatores regulatórios miogênicos (FRM) primários necessários para ativar células satélites,

além de permitir que elas se proliferem e se diferenciem (CHEN; ZAJAC;MACLEAN, 2005). O MyoD também regula positivamente a transcrição gênica da miostatina, um membro da superfamília dos fatores de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ), durante a maturação do miócito (BRADLEY; YAWORSKY;WALSH, 2008).

A miostatina é considerada a única proteína já descoberta capaz de regular negativamente o crescimento do músculo esquelético (LEE, 2004; JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006; HULMI et al., 2007). Ela inibe a progressão do ciclo celular suspendendo tanto a proliferação (THOMAS et al., 2000) quanto a diferenciação (LANGLEY et al., 2002) de mioblastos. Descoberta em 1997 (MCPHERRON;LEE, 1997), sua expressão vem sendo estudada em diversas doenças (TSUCHIDA, 2004). A redução nos níveis de miostatina promove hipertrofia, enquanto sua supressão resulta em hiperplasia muscular (HULMI et al., 2007; LOUIS et al., 2007; DELDICQUE et al., 2008).

Ao mesmo tempo em que reduz a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular (miogênese), a miostatina medeia a degradação muscular por aumentar a expressão de genes envolvidos na via proteolítica ubiquitina-proteassomo (MCFARLANE; SHARMA;KAMBADUR, 2008). Esta via constitui o sistema de degradação de proteínas mais importante envolvido no processo de atrofia muscular (NADER, 2005). Uma função fundamental dessa via é manter o controle de qualidade celular através da remoção de proteínas danificadas e patológicas (REINSTEIN;CIECHANOVER, 2006).

Recentemente duas novas enzimas da via ubiquitina-proteassomo que selecionam proteínas para serem degradadas foram identificadas: a Atrogina-1 (também conhecida como MAFbx) e o *Muscle RING Finger Protein 1* (MURF-1). A expressão dessas enzimas E3 de ligação à ubiquitina ocorre somente no músculo esquelético e aumentam em múltiplas situações de atrofia (BODINE ET AL., 2001; NADER, 2005; STEWART;RITTWEGER, 2006).

Em homens com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), portanto já em acentuado processo de degradação do músculo esquelético, a expressão de Atrogina-1 aumentou somente no grupo que associou treinamento resistido e tratamento com EAA (LEWIS et al., 2007). Além disso, *in vitro*, doses suprafisiológicas de EAA induziram apoptose em células neuronais (ESTRADA; VARSHNEY;EHRlich, 2006).

A contração do músculo esquelético é capaz de alterar os reguladores atroficos do músculo esquelético, incluindo as vias que regulam as ubiquitinas de ligação, além de alterar também a ativação de células satélites. Contudo, a interação entre modo de contração,

duração e intensidade do exercício podem modificar as respostas específicas do músculo esquelético (COFFEY;HAWLEY, 2007).

Ao longo dos anos, muitas evidências sugeriram que algumas formas de atividade física, como os exercícios de resistência, podem produzir um grande aumento na massa muscular esquelética. Em contraste, em muitos estados de doença ou condições ambientais desfavoráveis, a massa muscular esquelética pode sofrer uma grande redução, uma condição que pode trazer consequências desastrosas à saúde. Claramente, essas duas situações contrastantes representam o final de um mecanismo contínuo envolvido no balanço das forças que regulam a massa muscular esquelética. Entender esses mecanismos pode levar a uma melhor intervenção no processo de ganho ou perda de massa muscular (NADER, 2005).

Com a finalidade de alterar esse balanço de forças na direção do aumento da massa muscular esquelética, muitos atletas, fisiculturistas e pessoas que desejam melhorar a aparência abusam dos EAA. Porém, os mecanismos de ação dos EAA não são bem conhecidos.

Pelo nosso conhecimento ainda não existe estudo publicado que tenha investigado, em animais saudáveis, o comportamento de vias relacionadas à síntese e degradação do músculo esquelético em resposta ao treinamento resistido associado a doses supra-fisiológicas de EAA.

Para melhor entender o comportamento de vias atroficas e hipertróficas em respostas a doses supra-fisiológicas de EAA associadas ou não ao treinamento físico de alta intensidade, praticado cinco vezes por semana durante sete semanas e associado a, quantificamos a expressão gênica da miostatina, MyoD, atrogina-1 e MURF-1. Nossa hipótese foi de que o treinamento resistido de alta intensidade associado a doses supra-fisiológicas de EAA aumentaria a expressão de genes associados ao crescimento muscular, reduziriam a expressão de genes relacionados à atrofia muscular, ou ambos os processos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Esteróides Anabólicos Androgênicos (EAA)

#### 2.1.1. *História no mundo do esporte*

A testosterona foi isolada pela primeira vez em 1935. É amplamente aceito que o primeiro uso de EAA no esporte foi por um halterofilista russo, que usou testosterona em 1950. A experimentação subsequente novamente por halterofilistas, nos Estados Unidos, conduziu a difusão do uso da testosterona e EAA sintéticos por atletas em muitos esportes (MOTTRAM;GEORGE, 2000).

Até 1970 não existia nenhum método efetivo disponível para a detecção de EAA. O desenvolvimento de um método habilitou o Comitê Olímpico Internacional (COI), em 1975, a adicionar os EAA a sua lista de substâncias banidas. Os primeiros testes ocorreram nos Jogos Olímpicos de Montreal, em 1976. Procedimentos anteriores a esta data não conseguiam distinguir entre EAA sintéticos e esteróides endógenos, como a testosterona. Este problema foi parcialmente superado nos Jogos Olímpicos de 1984, quando todas as amostras foram examinadas por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa e os níveis de testosterona/epitesterona (T/E) foram introduzidos como um indicador do uso abusivo de testosterona (MOTTRAM;GEORGE, 2000). A administração de testosterona sintética aumenta a razão T/E na urina. Razões maiores que 6 eram consideradas provas do abuso de testosterona por atletas (AGUILERA et al., 2001).

Porém, até 1989 atletas alemães, homens e mulheres, frequentemente recebiam testosterona e EAA sem o seu conhecimento. O fim dessa prática ilegal não demarcou o fim do uso de EAA por atletas, mas ao contrário, seu uso parece estar mais difundido do que nunca (VOGEL, 2004). Atualmente, estas drogas são usadas para aumentar a massa muscular esquelética, diminuir a massa gorda, melhorar a performance, sustentar períodos intensivos de treino e melhorar a aparência (KADI, 2008). Acredita-se que eles interfiram nesses

parâmetros através do aumento da agressividade, da hostilidade (TALIH; FATTAL;MALONE, 2007) e da ansiedade (ROCHA et al., 2007).

### 2.1.2. O que são

Esteróides Anabólicos Androgênicos (EAA) são derivados sintéticos da testosterona (MOTTRAM;GEORGE, 2000; CLARK;HENDERSON, 2003). A testosterona é um hormônio esteróide sintetizado a partir do colesterol nas células de Leydig dos testículos de homens e ovários de mulheres. Circula pelo sangue ligada a albumina e globulina, mas aproximadamente 4% da quantidade total da testosterona circula livremente, sem se ligar a nenhuma proteína do plasma. É o esteróide circulante mais importante no homem e tem efeitos androgênicos. No músculo promove crescimento. Da testosterona livre que age sobre alguns tecidos, a maior quantidade é convertida a dihidrotestosterona (DHT), um andrógeno mais potente, mas um pouco é convertida em oestrogênios (estriol, estrona e estradiol) (Fig. 1) (HARRIDGE, 2006).

Os EAA foram produzidos para promover o máximo de efeitos na síntese de proteínas e crescimento muscular com o mínimo de efeitos androgênicos ou masculinizantes. Atualmente, aproximadamente 60 diferentes EAA estão disponíveis comercialmente. Eles variam em sua estrutura química e desse modo em seu destino metabólico e efeitos fisiológicos. Todos os EAA aparentemente possuem alguma atividade androgênica (MOTTRAM;GEORGE, 2000; CLARK;HENDERSON, 2003).

Originalmente os EAA foram desenvolvidos para o tratamento da disfunção hipogonadal em homens, iniciação atrasada da puberdade e promoção de crescimento, remoção cirúrgica dos testículos ou tumor no testículo. Atualmente continuam a serem usados para esses tratamentos, assim como para terapia em condições crônicas como HIV/AIDS, câncer, queimaduras severas, anemia, hepatite, comprometimento renal, câncer de mama e angiodema hereditário (MOTTRAM;GEORGE, 2000; CLARK;HENDERSON, 2003).

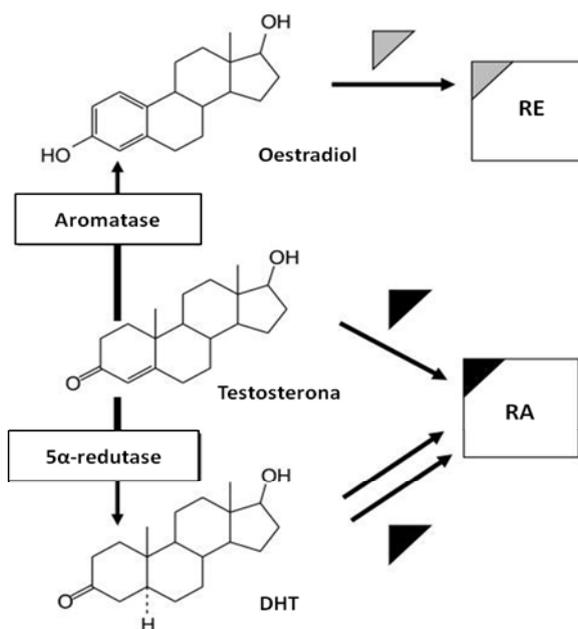


Figura 1. Estrutura química e mecanismo de ação da testosterona. A testosterona pode se ligar diretamente ao receptor andrógeno (RA). Em tecidos alvo, onde enzimas intracelulares estão envolvidas, a ação da testosterona é mediada pelo metabolismo. A testosterona é irreversivelmente convertida pela enzima 5 $\alpha$ -reductase a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), que se liga com grande afinidade ao RA, ou por aromatase a oestradiol, o qual se liga ao receptor oestradiol (RE). Além disso, a testosterona e o DHT também podem ser convertidos a andrógenos mais fracos (não mostrado). Este processo também é dependente do tecido possuir atividade da enzima necessária, por exemplo, 3 $\alpha$ -hidroxiesteróide dehidrogenase, 17 $\beta$  hidroxiesteróide dehidrogenase (adaptado de KICMAN, 2008).

### 2.1.3. Função

A testosterona é essencial para estabelecer e manter os órgãos reprodutivos nos homens. Além disso, possui ação anabólica em outros órgãos, incluindo músculo esquelético e osso (CHEN; ZAJAC; MACLEAN, 2005).

Quando usada oralmente, é absorvida pelo intestino delgado e passa via veia porta para o fígado onde é rapidamente metabolizada, principalmente para combinações inativas. A testosterona injetada também passa rapidamente para o sangue e depois para o fígado onde é inativada. Esta via aumenta muito a incidência de tumores do fígado. (MOTTRAM; GEORGE, 2000).

A testosterona se liga aos receptores de andrógenos para formar complexos que se associam a elementos promotores ou reforçadores (*enhancers*) de genes alvo, para regular sua transcrição (CHEN; ZAJAC; MACLEAN, 2005).

Os EAA agem numa ampla variedade de tecidos do corpo. Acredita-se que sua ação fisiológica fundamental ocorra através da ligação do hormônio com uma proteína

intracelular no tecido alvo. O complexo hormônio-receptor então se transloca para os sítios de ligação na cromatina, promovendo a transcrição gênica e subsequente síntese de RNA. Os efeitos dos esteróides variam em tecidos diferentes de acordo com os tipos de enzimas e os receptores presente. Contudo, os mecanismos biológicos específicos responsáveis pelas mudanças na força e composição corporal estão longe de se tornarem claros (BAHRKE;YESALIS, 2004).

A testosterona pura é relativamente ineficaz quando tomada oralmente ou em solução aquosa, por ser muito suscetível a quebra relativamente rápida pelo fígado antes de agir no tecido alvo – no caso de atletas, no músculo (BAHRKE;YESALIS, 2004).

A testosterona é a base da família dos esteróides anabólicos das substâncias ilegais consumidas por alguns atletas. Ela pode ser modificada de várias formas para reduzir seus efeitos androgênicos indesejáveis, assim como para torná-la injetável ou oral (HARRIDGE, 2006). A busca por derivados mais ativos da testosterona nos últimos 50 anos rendeu os três maiores tipos de modificações da testosterona, cada uma dando origem a uma classe de esteróides. Os EAA, assim como os andrógenos endógenos, são estruturas de quatro anéis com 19 átomos de carbono. Modificações da *androstane backbone* têm sido introduzidas para prolongar a meia-vida metabólica e assim a eficácia dos EAA sintéticos. As três classes principais que foram descritas são:

- Tipo A: a primeira, usada principalmente como combinações injetáveis, é derivada da esterificação do grupo  $17\beta$ -hidroxyl da testosterona, o propionato de testosterona e cipionato de testosterona. A esterificação retarda a degradação e prolonga a meia vida depois da injeção do hormônio, por ser liberada mais lentamente na circulação;
- Tipo B: a segunda classe é também uma combinação de ésteres andrógenos injetáveis chamados de derivados da 19-nor-testosterona. Estas combinações têm, em conjunto com a adição de uma longa cadeia carbônica, a substituição de um hidrogênio pelo grupo metil no C19, o que promove a extensão da meia-vida. Os EAA aromatizados das classes I e II podem ter um adicional e significativo efeito no sistema nervoso central não apenas no receptor androgênico, mas também ter as mesmas ações dos metabólitos estrógenos nos receptores de estrógenos no cérebro;
- Tipo C: a terceira classe dos EAA compreende as combinações que são alquiladas no C17. Devido a essa alquilação, o metabolismo pelo fígado fica retardado, além de ser ativo por ingestão oral (MOTTRAM;GEORGE, 2000; CLARK;HENDERSON, 2003).

A nandrolona é um caso especial. Desenvolvida em 1970, é administrada como decanoato de nandrolona (decadurabolin). Distinta da testosterona por não possuir nenhum grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição 19, também foi combinada com o ácido decanoico, um éster que o torna aceitável para injeção como um depósito de droga. As modificações estruturais da testosterona também renderam a nandrolona um esteróide anabólico com grande redução dos efeitos androgênicos, além de um potencial de conversão para o estradiol reduzido (MOTTRAM;GEORGE, 2000).

#### *2.1.4. Ação no músculo esquelético*

Os EAA aumentam o número de receptores de andrógenos (RA). RA, assim como os receptores de glicocorticóides (GCs), são membros de uma superfamília de receptores nucleares (CHEN; ZAJAC;MACLEAN, 2005). Existe uma atraente hipótese de que os EAA exercem um efeito anticatabólico por interferir na expressão do receptor de GCs (KICMAN, 2008). Alguns estudos hipotetizaram que os EAA interferem na ação dos GCs em nível gênico, interferindo com elementos de resposta do hormônio (BASARIA; WAHLSTROM;DOBS, 2001).

Outra hipótese é que quando os EAA são usados de forma abusiva por atletas, as drogas vão produzir seus efeitos por outro mecanismo receptor, inafetado pelas concentrações normais de testosterona e 5- $\alpha$ -DHT do plasma. Os GCs, como o cortisol e a corticosterona, são hormônios que influenciam a síntese de glicose e o catabolismo de proteínas. Quando o receptor de GCs é estimulado, a quebra de proteína no músculo é aumentada. De acordo com essa teoria, as altas doses de EAA usadas por muitos atletas deslocam os GCs de seus receptores, o que inibe o catabolismo de proteína no músculo, conduzindo todos os efeitos anabólicos e de construção muscular (MOTTRAM;GEORGE, 2000).

Muitos estudos têm mostrado que a administração de andrógenos para jovens hipogonadais e homens idosos resulta em aumento da massa magra (BASARIA; WAHLSTROM;DOBS, 2001). Os efeitos anabólicos da testosterona e dos EAA são conhecidos por promoverem a síntese de proteínas, crescimento muscular e eritopoiese. Contudo os EAA promovem também efeitos androgênicos, uma vez que a testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas e ósseas em jovens

(MOTTRAM;GEORGE, 2000). Seu uso prolongado acentua o grau de hipertrofia, mas somente em fisiculturistas muito bem treinados (KADI, 2008).

Indivíduos com experiência em treinamento de peso e que continuam treinando durante a administração de EAA, geralmente sofrem um aumento maior na força que o observado em indivíduos controle que apenas treinam. Porém, na maior parte dos estudos, a maioria dos participantes que tomaram EAA e que não tinham experiência ou não foram pré-treinados com pesos não ganharam mais força que indivíduos do grupo controle. Adicionalmente, o efeito da administração de doses excepcionalmente altas ou prolongadas (meses e anos) de EAA, em relação às capacidades físicas ou fisiológicas, ainda não foi investigado (BAHRKE;YESALIS, 2004).

A testosterona também pode reduzir a massa gorda, pois é um potente regulador da lipólise por influenciar a transdução de sinais das catecolaminas nas células adiposas (KADI, 2008).

Apesar dos estudos quanto aos efeitos dos EAA sobre massa e força musculares serem contraditórios, a posição do Colégio Americano de Medicina Esportiva (ACSM) é de que os EAA, na presença de um programa de treinamento de hipertrofia e de uma dieta adequada, podem contribuir para aumento do peso corporal, frequentemente no compartimento magro, mas deploram seu uso por atletas devido a grande incidência de efeitos colaterais (American College of Sports Medicine position stand on the use of anabolic-androgenic steroids in sports, 1987).

#### *2.1.5. Interação no esporte: efeitos deletério-adversos*

Drogar-se com EAA continua sendo o inimigo mais comum encontrado no esporte (KICMAN, 2008). Os EAA, de maneira semelhante à testosterona endógena, induzem comportamento agressivo. O tônus serotoninérgico diminuído é o pivô para a habilidade dos EAA em aumentar a agressão. Estudos sugerem que a exposição crônica a altas doses de EAA altera a expressão de dopamina e receptores da dopamina em regiões do cérebro importantes para a recompensa mediada, aumentando assim o abuso com outras drogas como a cocaína e anfetaminas. Os EAA também promovem mudanças significativas na ansiedade (CLARK;HENDERSON, 2003; ROCHA et al., 2007).

Os EAA estão associados a efeitos colaterais severos (BAHRKE;YESALIS, 2004). Os mais freqüentes encontrados em atletas e “cultivadores” do corpo estão descritos na tabela 1

*Tabela 1. Principais efeitos adversos dos EAA (KICMAN, 2008)*

Alvo	Efeitos adversos
Osso	Fechamento prematuro da epífise na criança
Seios	Atrofia em mulher Ginecomastia e mamilo aumentado em homens
Cardiovascular	Risco aumentado de eventos trombóticos, como infarto do miocárdio Danos cardíacos (hipertrofia do ventrículo esquerdo, fibrose e falha cardíaca) Morte cardíaca súbita
Comportamento	Libido aumentada em homens e mulheres, o que pode dificultar o controle Agressão e hostilidade aumentadas Impulsos destrutivos Impulsos autodestrutivos Depressão
Cabelos	Calvície
Fígado	Função prejudicada Obstrução do canal da bile causando icterícia Obstrução do fluxo sanguíneo Maiores chances de tumores
Sistema reprodutor	Supressão dos esteróides gonadais Amenorréia Hipertrofia do clitóris Atrofia Testicular Crescimento interno da próstata desproporcional
Pele	Acne
Cordas vocais	Alongamento na mulher
Outros	Sérias infecções associadas à drogas injetadas Toxicidade de produtos sem licença

## **2.2. Sistema Músculo-Esquelético**

### *2.2.1. Estrutura*

Um pouco menos que metade da massa do corpo humano de adultos (40-50%) é composta de músculo esquelético (BROOKS, 2003; CARMELI et al., 2004). Cada um dos mais de 600 músculos esqueléticos do corpo humano são compostos de centenas de milhares de células individuais, alongadas e multinucleadas, chamadas fibras (Fig. 2).

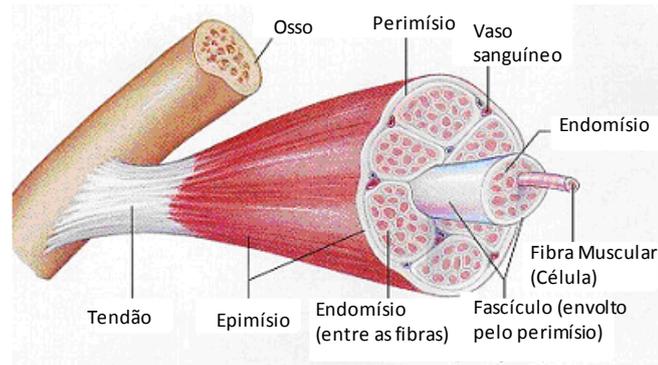


Figura 2. Corte transversal de um músculo esquelético e suas subunidades (Adaptado de MARIEB;HOEHN, 2007).

Dentro de uma única fibra, as proteínas contráteis de actina (filamentos finos), miosina (filamentos grossos) e titina são arranjadas em bandas, repetidas longitudinalmente, formando os sarcômeros (Fig. 3). Por sua vez, os sarcômeros em série formam as miofibrilas, e em cada fibra, existem muitas miofibrilas em paralelo (BROOKS, 2003).

A titina é uma proteína sarcomérica gigante, que contribui para as propriedades elásticas da miofibrila. O encurtamento ou o alongamento da fibra muscular cria uma força sobre a titina, a qual é direcionada para reestabelecer o comprimento do repouso (TOIGO;BOUTELLIER, 2006). A titina ajuda a manter a integridade dos sarcômeros (FAVIER; BENOIT;FREYSSNET, 2008).

As miofibrilas, elemento contrátil do músculo esquelético, são envolvidas por uma membrana, o sarcolema que é impermeável a fluidos extracelulares em condições normais. Possui um importante papel na manutenção da homeostase eletrolítica das miofibrilas (CARMELI et al., 2004).

O sarcolema é constituído por material polissacarídeo que contém inúmeras e finas fibrilas colágenas. Em cada extremidade da fibra muscular o sarcolema se funde com uma fibra tendinosa e estas se juntam em feixes para formar os tendões dos músculos, que se inserem nos ossos. O sarcoplasma é a matriz intracelular da fibra muscular e é composto pelos constituintes intracelulares habituais, além do retículo sarcoplasmático, extremamente importante na contração muscular (GAYTON;HALL, 2002).

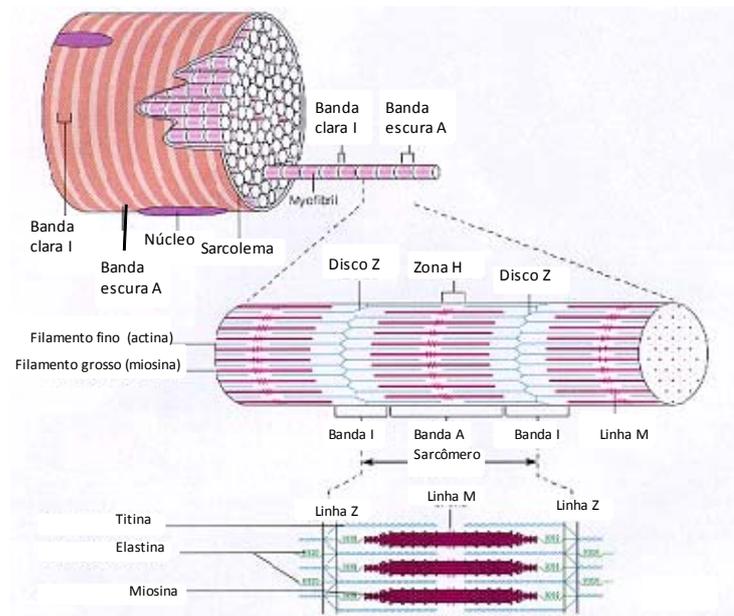


Figura 3. Organização do músculo esquelético (Adaptado de MARIEB;HOEHN, 2007).

Pesquisas enfatizam a presença de heterogeneidade metabólica entre os diferentes músculos e dentro de cada músculo esquelético (ARMSTRONG;LAUGHLIN, 1985). Os músculos esqueléticos possuem um amplo espectro de propriedades morfológicas, contrátil e metabólica, devido à existência de diferentes tipos de fibras, como por exemplo, fibras tipo I e tipo II ou fibras rápidas e fibras lentas (LIEBER, 1992).

Dentre os importantes fatores determinantes das características musculares se encontram: o tipo de inervação, atuação de hormônios, atividade contrátil e condição de alongamento (GUNNING;HARDEMAN, 1991; STARON et al., 1993; GOLDSPIK, 1998).

### 2.2.2. Função

A função do músculo esquelético estriado é produzir movimento (GAYTON;HALL, 2002). Os músculos convertem energia química obtida da hidrólise do ATP em calor e se encurtam, em trabalho mecânico (BARCLAY;WEBER, 2004). As contrações do músculo esquelético geram estabilidade e força para todos os movimentos do corpo. Conseqüentemente, qualquer prejuízo na função do músculo esquelético resulta em

pelo menos algum grau de instabilidade ou imobilidade Sua função pode ser prejudicada como resultado de lesão, doença, ou envelhecimento. A função muscular prejudicada provoca impacto na qualidade de vida (BROOKS, 2003).

Os músculos podem se adaptar para se ajustarem às alteradas demandas funcionais (TOIGO;BOUTELLIER, 2006). Parece existir uma relação linear entre atividade física e o estado de saúde, de modo que um aumento adicional na atividade física e aptidão resultam em melhorias adicionais no estado de saúde. Existe uma relação teórica entre a idade da pessoa e sua saúde músculo-esquelético. Até aproximadamente 25 anos de idade essa relação é positiva. A partir daí começa a ocorrer um declínio fisiológico na aptidão do músculo esquelético que pode levar a pessoa até a uma dependência funcional nas atividades diárias. A atividade física pode atenuar esse declínio, aumentando a aptidão do músculo esquelético, o que está positivamente associado com a independência funcional, mobilidade, homeostase da glicose, saúde óssea, bem-estar psicológico, e melhor qualidade de vida, além de estar negativamente associada a risco de quedas, doenças e morte prematura (WARBURTON; NICOL;BREDIN, 2006a; b).

A força de um músculo é determinada principalmente por seu tamanho, com força contrátil máxima entre 3 e 4 Kg/cm<sup>2</sup> de área muscular em corte transversal (GAYTON;HALL, 2002). O aumento na massa do músculo esquelético é influenciado por diversos fatores, incluindo o tipo de treinamento, a sobrecarga e a frequência de treino O ganho ou a redução de músculo esquelético é resultado de um aumento na taxa da síntese de proteína, uma redução na taxa de degradação, ou ambos os processos (MASCHER et al., 2008). Porém esses processos bioquímicos não ocorrem independentemente um do outro: parecem ser minuciosamente coordenados por uma complicada rede sinalizadora de comunicações. Tais redes de sinalização são responsáveis por orquestrar estímulos ambientais e celulares que vão determinar em última estância se as proteínas serão sintetizadas ou degradadas (NADER, 2005).

O crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético vem há muito tempo interessando os cientistas devido à sua habilidade tanto para responder quanto para adaptar-se a mudanças nos estímulos do meio ambiente, conduzindo a um conjunto de adaptações metabólicas e morfológicas, as quais possibilitam ao músculo encontrar uma melhor condição de demanda de energia para sustentar a atividade física. Certamente, as adaptações estruturais e funcionais do músculo esquelético ao treinamento físico envolvem alterações na expressão de diversos genes regulatórios. Em particular, mudanças na expressão de proteínas

miofibrilares e metabólicas tem sido frequentemente demonstradas estarem envolvidas na plasticidade do músculo esquelético (MATSAKAS;DIEL, 2005).

Sabe-se que a atividade física intensa está associada a lesões musculares ultraestruturais que são seguidas pelos processos de inflamação e de regeneração. Durante carga muscular intensa em humanos, estresses de cisalhamento associados à produção de força axial intramuscular influenciam a rede não homogênea da matriz extracelular (MEC), que sinaliza aos fibroblastos para liberação de fatores de crescimento que subseqüentemente iniciarão a ativação das células satélite inativas. (KJAER, 2004).

### 2.2.3. Células Satélites

Células satélites são células quiescentes, localizadas entre a lâmina basal e o sarcoplasma das fibras musculares (Fig. 4). Elas podem ser ativadas por diversos estímulos mecânicos ou fatores de crescimento, assim como por sinalização hormonal. Quando ativadas, podem se proliferar e voltar ao estado quiescente para abastecer o reservatório de células satélites ou podem se diferenciar para gerar novos mionúcleos ou novas miofibrilas (KADI, 2008), sendo essenciais para crescimento e o reparo muscular (MCCLUNG et al., 2005; TOIGO;BOUTELLIER, 2006).

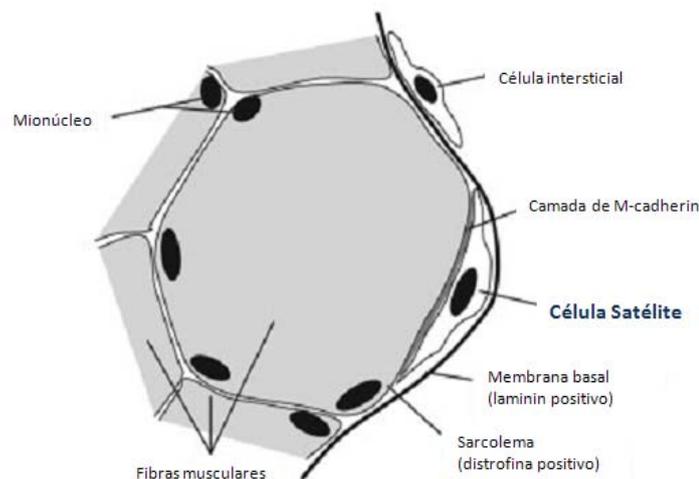


Figura 4. Localização da célula satélite, vista em corte transversal do músculo esquelético (adaptado de LEGERLOTZ;SMITH, 2008).

Como algumas células satélites ativadas podem escapar da diferenciação e retornar ao estado quiescente, sua ativação leva a geração de novas células satélites. Em fisiculturistas que usaram EAA por  $9 \pm 3.3$  anos, o número de células satélites é maior do que em homens não treinados, porém permanece igual à fisiculturistas não usuários de EAA (KADI, 2008).

O exercício resistido de alta intensidade é capaz de promover microtraumas aos componentes estruturais e contráteis do músculo esquelético, o que pode ativar células satélites. A ativação e diferenciação dessas células satélites em novas células musculares é um mecanismo adicional que contribui para a hipertrofia compensatória (TOIGO;BOUTELLIER, 2006; COFFEY;HAWLEY, 2007).

Para possibilitar o crescimento e a manutenção do tecido muscular, uma multiplicidade de eventos complexos é necessária e esse processo de desenvolvimento muscular é denominado miogênese. Um dos principais passos do desenvolvimento muscular é a diferenciação de mioblastos (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

Após serem estimuladas, as células satélites saem da fase G<sub>0</sub> do ciclo celular e entram na fase G<sub>1</sub>. (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006). Nas células em proliferação, G<sub>1</sub> é o período entre o “nascimento” de uma célula que é seguido pela mitose e a iniciação da síntese de DNA, o que marca o início da fase S. O final da fase G<sub>2</sub> é marcado pelo início da mitose, onde o fuso mitótico se forma e separa as cromátides irmãs, seguida pela divisão do citoplasma (citocinese) para produzir duas células-filhas. A maioria das células sai do ciclo em G<sub>1</sub> e entram novamente no estado G<sub>0</sub> (LODISH H et al., 2005)

Está bem estabelecido que a interrupção irreversível do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> é um pré-requisito necessário para a indução da diferenciação de mioblastos. Conseqüentemente, mudanças na expressão dos fatores reguladores do ciclo celular, incluindo aumento de expressão da p21, são observadas na indução de mioblastos. Este aumento de expressão é parte da diferenciação miogênica e acredita-se que ela seja aumentada pela MyoD. Mioblastos diferenciados saem irreversivelmente do ciclo celular para unirem-se aos miofibros multinucleados (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

Estes eventos estão associados à expressão ordenada de um conjunto de proteínas específicas do músculo envolvidas em particular na organização dos aparatos contráteis do músculo. Estes estágios precoces do desenvolvimento muscular são regulados por fatores de transcrição – fator miogênico 5 (Myf5), fator D de diferenciação miogênica (Myod), fator regulatório Miogênico 4 (MRF4) e Myogenin - denominados fatores regulatórios miogênicos (FRM). Myod e Myf5 estão envolvidos na determinação da linhagem

muscular; enquanto a myogenin possui uma função chave na diferenciação terminal de mioblastos, e o MRF4 pode regular a maturação da fibra muscular (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

#### 2.2.4. *MyoD*

O MyoD é necessário para ativar as células satélites, permitir que elas se proliferem e diferenciem (CHEN; ZAJAC;MACLEAN, 2005). A MyoD é expressa em mionúcleos e células satélites ativadas, sendo um ótimo marcador de ativação dessas células. É altamente sensível ao aumento ou redução da atividade física, estando também envolvida no processo de plasticidade muscular (LEGERLOTZ;SMITH, 2008).

A influência de treinamento resistido sobre a regulação da expressão de MyoD permanece incerta, já que alguns estudos reportaram aumento de expressão (KOSEK et al., 2006; RAUE et al., 2006; OKADA et al., 2008), enquanto em outros nenhuma alteração foi observada (KVORNING et al., 2007; LOUIS et al., 2007; DELDICQUE et al., 2008; HULMI et al., 2008). Já em resposta a uma única sessão de exercício resistido, a expressão de MyoD aumenta tanto em roedores quanto em humanos (COFFEY;HAWLEY, 2007).

A MyoD também regula positivamente a transcrição gênica da miostatina, um membro da superfamília TGF- $\beta$ , durante a maturação do miócito (BRADLEY; YAWORSKY;WALSH, 2008).

#### 2.2.5. *Miostatina*

Por mais de 200 anos algumas raças de gados chamados de “músculos duplos”, como os *Belgian Blue*, chamaram a atenção de pesquisadores devido a grande massa muscular esquelética que exibiam. Mas foi somente em 1997 que McPherron; Lee, enquanto procuravam por possíveis relações entre a bem conhecida superfamília do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que identificaram um novo membro dessa família. Este

novo membro funciona como um regulador negativo da massa do músculo esquelético e foi intitulado de Fator de Crescimento e Diferenciação 8 (GDF-8) (MCPHERRON;LEE, 1997).

Este novo gene é homólogo aos membros de sua família TGF- $\beta$ , sendo altamente conservado entre diferentes espécies (MCPHERRON;LEE, 1997), sugerindo a conservação de sua função (LEE, 2004).

Atualmente conhecido por miostatina, o GDF-8 possui mutações no seu gene responsáveis pelo fenótipo de músculo duplo em gados (LEE, 2004). A inativação de seu gene em ratos resultou no aumento de 2-3 vezes no tamanho muscular, resultante tanto de hiperplasia quanto de hipertrofia (MCPHERRON;LEE, 1997). Homozigotos mutantes apresentaram o dobro do peso muscular e heterozigotos tiveram um aumento de 25% quando comparados ao camundongo não mutante. Resultados de diversos estudos sugerem que a inibição moderada ou baixa da miostatina leva a uma hipertrofia muscular, enquanto sua supressão total também induz a hiperplasia (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006), sugerindo que o efeito da miostatina é dose-dependente (LEE, 2004).

A inibição da miostatina em ratos adultos jovens, através do uso de injeções de anticorpo anti-miostatina, por 2-4 semanas, levou ao aumento no tamanho do músculo esquelético de 13 a 30%, tanto em machos quanto em fêmeas. Este tratamento não alterou a histologia, o tamanho dos órgãos e nem parâmetros do soro, sugerindo que a inibição da miostatina em adultos altera especificamente o tamanho do músculo esquelético, sem efeitos colaterais (WHITTEMORE et al., 2003).

Os membros dessa extensa superfamília TGF- $\beta$  de citocinas sinalizadoras têm um papel crucial na homeostasia do tecido através da regulação do crescimento celular, agindo como um potente inibidor da proliferação celular, modulação das respostas imunes ou promovendo eritropoiese (MATSAKAS;DIEL, 2005).

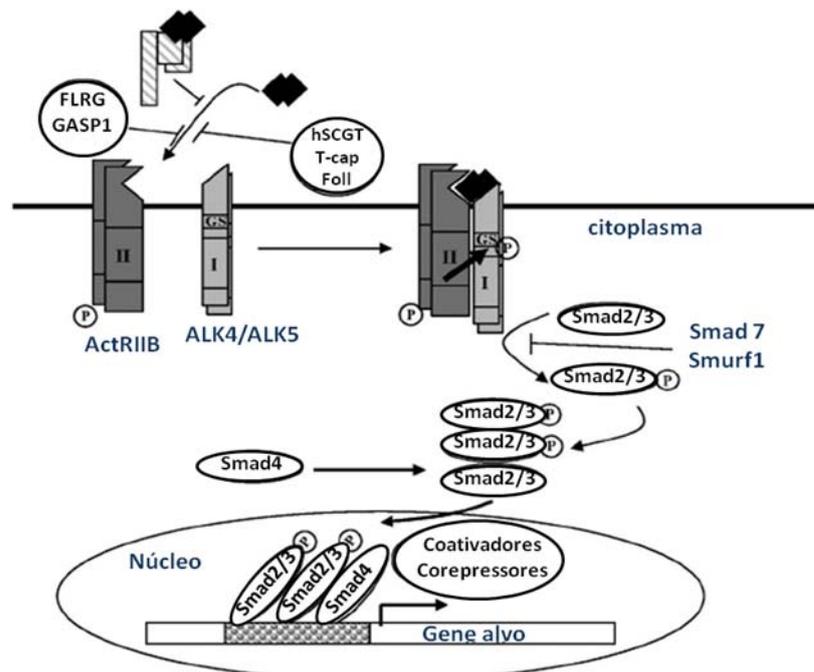


Figura 5. Supostos elementos da via metabólica da miostatina. A miostatina pode ser encontrada no soro ou localmente num estado inativo quando ligada a FLRG, GASP-1, hSGT, T-cap, folistatina ou ao propeptídeo miostatina. O dimero ativo da miostatina liga-se ao receptor activin tipo II, o qual recruta e ativa o receptor do tipo I (ALK4 ou ALK5) por transfosforilação. Então a Smad2 e Smad3 são ativadas. Elas formam um agregado com a Smad4 e são translocadas para o núcleo, ativando a transcrição do gene alvo (p21). Dois inibidores desta sinalização foram identificados: Smad 7 e Smad1. Smad7 reprime a sinalização da miostatina porque se liga ao domínio MH2 dos receptores ativados, prevenindo assim o recrutamento e ativação das R-Smads (adaptado de JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006)

Como um membro da superfamília TGF- $\beta$ , especulou-se que a miostatina compartilhe a mesma via metabólica de sinalização que outros membros dessa família, incluindo a fosforilação da Smad. Estudos estabeleceram que a Smad2 e a Smad3, mas não a Smad1 ou a Smad5 estão envolvidas com a sinalização da miostatina. A co-Smad4 foi identificada como potencializadora dessa via (Fig. 5), enquanto a Smad7 e a Smad1 inibi a via. Somando-se a isso, a expressão de Smad7 é induzida pela miostatina, tornando-se um regulador negativoda via por mecanismo de feedback (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

A miostatina é a única proteína já reconhecida que regula negativamente o crescimento do músculo esquelético (LEE, 2004). Ela age via Smad 2/3 (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006) alterando a expressão de proteínas do ciclo celular. A miostatina aumenta a expressão da proteína p21, o que inibe as quinases dependentes de ciclina. Com as quinases inibidas, ocorre uma redução na fosforilação do retinoblastoma. O retinoblastoma hipofosforilado inibe a proliferação de mioblastos e a expressão de MyoD, inibindo também a

diferenciação terminal dos mioblastos (Fig. 6) (THOMAS et al., 2000; LANGLEY et al., 2002; JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006; LEGERLOTZ;SMITH, 2008).

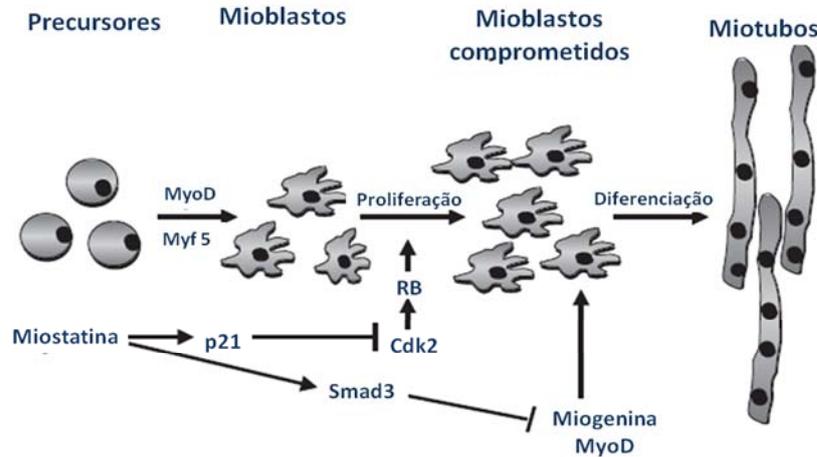


Figura 6. A função proposta da miostatina durante o crescimento e diferenciação muscular. Durante a embriogênese miogênica, Myf5 e MyoD determinam o destino miogênico das células. A proliferação de mioblastos é regulada pela miostatina via regulação positiva da p21 e inativação da atividade Cdk, resultando em hipofosforilação do retinoblastoma (Rb) e suspensão do ciclo celular dos mioblastos. A diferenciação dos mioblastos é afetada pela miostatina, que inibi a expressão de MyoD, via Smad 3 (adaptado de MATSAKAS;DIEL, 2005).

A sequência de aminoácidos da miostatina é composta por 376 resíduos de aminoácidos, divididos em sequência sinal N-terminal, um sítio de processamento proteolítico (RSRR), e uma região C-terminal (Fig. 7) (SHARMA et al., 2001; JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006). Sintetizada como um precursor, a sua forma madura é constituída pelo fragmento C-terminal de 12KDa. As formas não processada e madura da miostatina formam dímeros que se ligam por pontes de dissulfeto, sendo que o dímero da miostatina madura representa a única forma ativa da proteína (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

No tecido adulto, a miostatina é expressa quase que exclusivamente no músculo esquelético, embora níveis de RNAm da miostatina também tenham sido encontrados no tecido adiposo (MCPHERRON;LEE, 1997), no plasma e em outros tecidos. (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006). Além disso, existe em grande quantidade em um complexo latente com outras proteínas, incluindo seu propeptídeo (MATSAKAS;DIEL, 2005).

Todos os músculos esqueléticos investigados até agora expressam algum RNAm da miostatina, mas a quantidade varia de músculo para músculo (LEE, 2004). Muitos estudos têm relatado que o mRNA da miostatina é sintetizado preferencialmente em fibras do

tipo rápidas (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006), indicando uma função específica do tipo de fibra (MATSAKAS;DIEL, 2005).

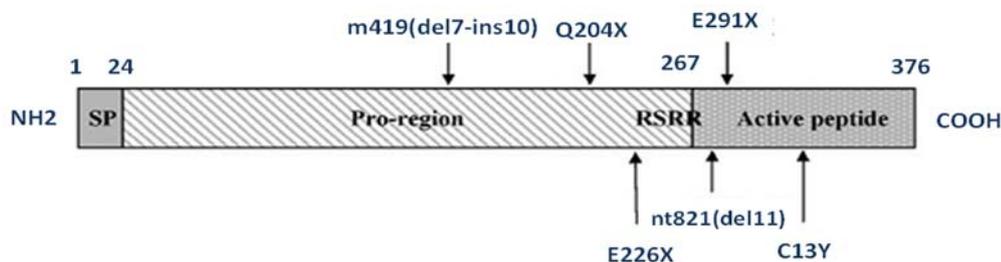


Figura 7. Estrutura da proteína miostatina e as mutações naturais que ocorrem no gene da miostatina em bovinos. Os tres domínios representados nesse esquema são o peptídeo sinal (SP), a pró-região, a qual vai ser clivada pela digestão proteásica no sítio RSRR durante a maturação e o peptídeo ativo na parte C-terminal do precursor da miostatina. As setas indicam a posição das mutações inativadoras que são responsáveis pelo aumento do crescimento muscular observado em algumas raças de gados (adaptado de JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006)

Em relação ao tecido adiposo, os efeitos da miostatina ainda não estão bem claros. Estudos realizados indicam que ratos deficientes em miostatina são caracterizados por uma redução significativa no acúmulo de gordura com o aumento de idade, apesar de terem a ingestão de comida e temperatura corporal normais, além da pequena redução na taxa metabólica (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

Recentemente foi identificada uma mutação natural do gene da miostatina em um jovem garoto. Ele produz proteínas truncadas, causada pela presença de um código de parada prematuro. O fenótipo é o de um grande aumento na massa muscular esquelética associada a um decréscimo na acumulação de gordura. A inativação usando injeções de anticorpo ou propeptídeo da miostatina ou a inativação do gene em camundongos mdx, que se relacionam as distrofias muscular de Duchenne e Bécker, melhorou a função muscular (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

Evidências recentes sugerem que a miostatina também possa ter uma função no treinamento induzindo adaptações no músculo esquelético (MATSAKAS;DIEL, 2005). Um único treino de exercício resistido, somente em indivíduos previamente treinados, é capaz de reduzir os níveis de RNAm da miostatina (HULMI et al., 2007; LOUIS et al., 2007; DELDICQUE et al., 2008), enquanto o treinamento resistido de longa duração aumentou a expressão basal de miostatina (WILLOUGHBY, 2004; HULMI et al., 2007; KVORNING et al., 2007).

Algumas situações que acarretam a atrofia muscular, como a imobilização, induzem significativo aumento na expressão da miostatina, mas essas mudanças retornam aos

valores basais com 4 dias de exercícios depois do fim da imobilização. A atrofia observada em pacientes infectados com HIV também está acompanhada de altos níveis de expressão de miostatina, o que pode levantar a hipótese da miostatina estar envolvida com a perda de massa muscular encontrada em doenças ou ao processo de envelhecimento (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006).

Análises moleculares revelaram que miostatina em excesso induz a expressão de atrogina-1, porque reduz a fosforilação de Akt (também chamada de PKB; proteína kinase B), o que provoca aumento na atividade de forkhead transcription factor (FOXO) (MCFARLANE; SHARMA;KAMBADUR, 2008)

#### 2.2.6. *Atrogina-1 e Murf-1*

A atrofia muscular, também chamada de perda muscular, é uma consequência da degradação de muitas proteínas contráteis, com conseqüente redução na área total da fibra muscular (NADER, 2005).

O envolvimento da via metabólica ubiquitina-proteassomo durante a atrofia do músculo esquelético foi bem estabelecida (GLASS, 2005). Até agora, quatro diferentes sistemas envolvidos na degradação de proteínas durante a atrofia muscular foram identificados:

- I. o sistema lisossomal;
- II. o sistema calpaina;
- III. o sistema apoptótico (via caspase);
- IV. e o sistema ubiquitina-proteassomo.

Até o momento não está clara a contribuição de cada sistema no processo de atrofia, mas o último sistema parece ser o mais importante na atrofia do músculo esquelético (NADER, 2005).

A adição de ubiquitina a um substrato da proteína foi reconhecido como um regulador do processo de atrofia, e a estimulação da proteólise observada durante este processo mostrou ocorrer, pelo menos em parte, devido à ativação da via metabólica ubiquitina-proteassomo (GLASS, 2005).

O sistema ubiquitina-proteassomo envolve duas etapas sucessivas (Fig. 8): Na primeira etapa a proteína alvo é poliubiquitinada e na segunda etapa a proteína alvo, já poliubiquitinada, é reconhecida pelo proteassomo 26S, o qual degrada o substrato em peptídeos (VENTADOUR;ATTAIX, 2006).

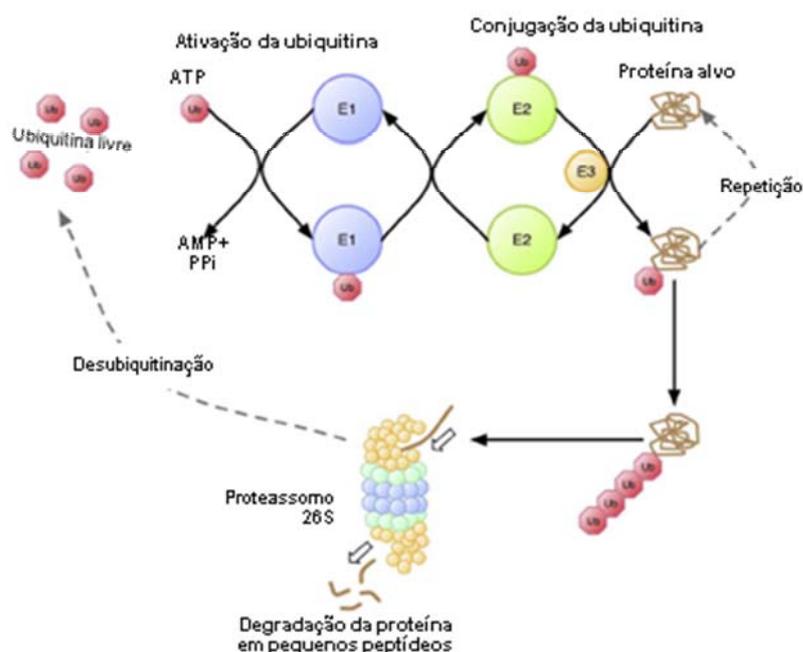


Figura 8. Esquema da degradação de uma proteína via sistema ubiquitina proteassomo. Representação do sistema detalhando a ativação, a conjugação e a ligação de ubiquitinas livres à proteína alvo. A adição de 4 ou mais ubiquitinas a uma proteína é suficiente para que ela entre no proteassomo 26S e seja por ele degradada. Subsequentemente as ubiquitinas são recicladas (adaptado de MURTON; CONSTANTIN;GREENHAFF, 2008)

A poliubiquitinação envolve reações sequenciais das enzimas E1, que ativa a ubiquitina, E2, que conjuga a ubiquitina, e da enzima E3, que liga a ubiquitina à proteína ser degradada (VENTADOUR;ATTAIX, 2006).

Essas reações de conjugação são repetidas até que pelo menos quatro ubiquitinas tenham se ligado ao substrato da proteína (MURTON; CONSTANTIN;GREENHAFF, 2008). Essa modificação do substrato leva a sua rápida degradação por um complexo proteolítico muito grande, o proteassomo 26S, o qual requer ATP para funcionar. Os peptídeos produzidos pelo proteassomo são liberados e rapidamente degradados a aminoácidos pelas peptidases, no citoplasma, ou transportados para o retículo endoplasmático e reutilizados. As ubiquitinas não são degradadas, são liberadas e usadas novamente (MITCH;GOLDBERG, 1996).

Esse sistema teve seu interesse renovado devido à descoberta de dois genes (BODINE et al., 2001) que codificam E3 específicas do músculo esquelético. Chamados de

atrofina-1/MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*) e MuRF1 (*Muscle Ring Finger1*), estão relacionados a atrofia muscular (NADER, 2005).

Tanto atrofina-1 quanto MuRF-1 são ativadas com a redução da atividade do músculo, como por suspensão, imobilização ou desenervação. Elas também estão marcadamente aumentadas em estados catabólicos como caquexia, diabetes e uremia (FAVIER; BENOIT;FREYSSNET, 2008). Essas E3 de ligação são responsáveis pelo aumento na degradação de proteínas através do sistema ubiquitina-proteassomo (BASSEL-DUBY;OLSON, 2006).

A Atrofina-1 contém um domínio F-box, um característico motivo visto na família de ubiquitinas de ligação E3, chamado de SCFs (para Skp 1, Cullin, F-box). Essa E3 de ligação se liga a um substrato apenas depois que ele sofreu uma modificação pós-traducional, por exemplo, por fosforilação. Isso sugere um mecanismo pelo qual o potencial substrato é primeiro fosforilado em resposta a um estímulo que induz atrofia, e depois degradado via atrofina-1 (GLASS, 2005).

A atividade de ubiquitinação de MuRF-1 depende da presença de um domínio RING. Foi demonstrado recentemente que ele pode induzir a ubiquitinação da forma cardíaca da troponina I, indicando que MuRF-1 degrada componentes do aparato contrátil (GLASS, 2005). Também foi sugerido que MuRF-1 se liga a proteína miofibrilar que provê tensão passiva dentro do músculo, a titina. Parece também estar envolvida no processo de *turnover* desta proteína. Quando a ligação de MuRF-1 com a titina é rompida, por exemplo por inatividade, essa ubiquitina-ligase pode mover-se para o núcleo, onde inicia um programa gênico de atrofia (BAAR; NADER;BODINE, 2006; TOIGO;BOUTELLIER, 2006).

Apesar dessas E3 de ligação serem moléculas chaves para a atrofia do músculo, o conhecimento sobre seu substrato e especificidade é limitado. Foi demonstrado que a MyoD é substrato para a atrofina-1, enquanto a troponina-1, em cardiomiócitos (FAVIER; BENOIT;FREYSSNET, 2008), e a cadeia pesada de miosina (SANDRI, 2008) são alvos da MuRF-1.

Tanto a atrofina-1 quanto MuRF-1 são expressas especificamente no músculo esquelético (TOIGO;BOUTELLIER, 2006). Estudos celulares ou modelos de atrofia e hipertrofia em ratos, que usaram técnicas de inibição gênica ou farmacológica, mostraram que a regulação transcricional de atrofina-1 e MuRF-1 é controlada por uma via de sinalização dependente de AKT/FOXO (Fig. 9). Em situações de atrofia do músculo esquelético, tanto em ratos *in vivo* quanto em miotubos *in vitro*, a redução da ativação da via AKT permite a transcrição de atrofina-1 e MuRF-1 (LEGER et al., 2006)

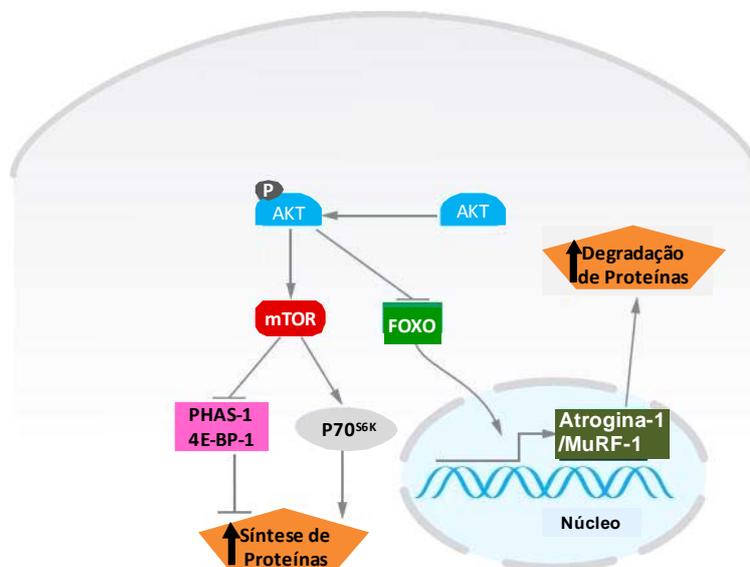


Figura 9. A via AKT/FOXO. Quando a via de sinalização AKT/mTOR é ativada, a AKT é fosforilada fosforilando o FOXO, o que impede sua entrada no núcleo. Em estados doentes, AKT não é ativada e o FOXO desfosforilado entra no núcleo e induz a expressão gênica de atrogina-1 e MuRF-1, promovendo atrofia muscular (adaptado de SANDRI, 2008).

O treinamento de força aumenta a fosforilação de AKT ao mesmo tempo reduz o conteúdo nuclear da proteína de FOXO. Contudo, concomitantemente ocorre um acentuado aumento na expressão de atrogina-1 e MuRF-1, sugerindo que essas E3 de ligação podem ser reguladas por outra via além de AKT/FOXO (FAVIER; BENOIT;FREYSSNET, 2008). Evidências recentes sugerem que as que o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e o fator nuclear -Kappa B ((NF)- $\kappa\beta$ ) também participam da regulação da atrogina-1 e MuRF-1, respectivamente (LI et al., 2005; MURTON; CONSTANTIN;GREENHAFF, 2008).

O exercício resistido atenua o aumento que a atrogina-1 e MuRF-1 tem em resposta a retirada de carga (FAVIER; BENOIT;FREYSSNET, 2008). Na verdade pouco se sabe sobre o comportamento desses genes pós-exercício. A expressão de Atrogina-1 pode aumentar logo após uma sessão de exercício resistido (DELDICQUE et al., 2008) ou permanecer inalterada (LOUIS et al., 2007; MASCHER et al., 2008), mas, a partir de 8 h pós-treino, reduz seus níveis (LOUIS et al., 2007; DELDICQUE et al., 2008; MASCHER et al., 2008). Os níveis do RNAm da Atrogina-1 não voltam a subir após a segunda sessão de treino (MASCHER et al., 2008). A expressão de MuRF-1 aumenta logo após uma sessão de exercício resistido (LOUIS et al., 2007; MASCHER et al., 2008) e volta a subir depois da segunda sessão de treino (MASCHER et al., 2008).

### 2.2.7. O modelo de treinamento em salto

O modelo de treino resistido (TR) em salto, utilizado nesse estudo, denominado também de treino pliométrico (TP), compreende ciclos de contração excêntrica de alta intensidade seguida de imediata contração concêntrica, forte e rápida. Este modelo de treinamento pode melhorar a habilidade do salto vertical (MARKOVIC, 2007), força muscular e estabilidade articular (MARTEL et al., 2005).

A força muscular da perna e a performance do salto vertical são considerados elementos críticos para o sucesso do atleta. A maioria dos técnicos esportivos usa o TP quando desejam melhorar a força dos membros inferiores e o salto vertical de seus atletas (MARKOVIC, 2007).

O TP praticado na água, por atletas de voleibol, melhorou a altura do salto vertical. Além disso, reduziu as lesões que o TP praticado fora da água provoca (MARTEL et al., 2005).

Adaptações ao treinamento resistido incluem aumentada síntese de proteínas, via adaptações regulatórias nos mecanismos de transcrição e tradução. Além das adaptações na produção de células musculares que são adicionadas às miofibrilas existentes, o que provê uma maquinaria contrátil adicional para gerar força. Em adição, enquanto certo grau de degradação de proteínas é necessário para o remodelamento muscular, o treinamento resistido também pode reduzir a ativação prolongada das vias de atrofia, resultando em suplementar síntese de proteínas (COFFEY;HAWLEY, 2007).

O modelo de treinamento usado neste estudo compreende ciclos de contração excêntrica de alta intensidade seguida por contração concêntrica rápida e potente. (MARKOVIC, 2007). Este modelo de treinamento pode melhorar o salto vertical (MARKOVIC, 2007), a força e a potência muscular e a estabilidade do joelho (MARTEL et al., 2005). Como a força muscular e o desempenho do salto vertical são considerados elementos críticos para o sucesso dos atletas, a maioria dos técnicos escolhem este modelo quando desejam melhorar a musculatura da perna e o salto vertical (MARKOVIC, 2007).

O experimento foi conduzido em modelos animais porque, além de ser possível controlar melhor as variáveis, o uso de doses supra-fisiológicas de EAA com a finalidade de melhorar o desempenho é proibido no país, o que impossibilita que este estudo seja realizado com humanos.

O músculo gastrocnêmio foi escolhido por ser um músculo muito solicitado neste protocolo experimental.

### **3. OBJETIVO**

Esta pesquisa teve como objetivo estudar as alterações nas vias de hipertrofia/atrofia muscular, através da quantificação relativa dos genes miostatina, MyoD, Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo gastrocnêmio de ratos, decorrentes do treinamento resistido de alta intensidade, do tratamento com doses suprafisiológicas do esteróide Deca-Durabolin®, ou da associação de ambos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, aprovado pelo comitê de ética da UFSCar (protocolo CCEA nº 002/2006), foi utilizado vinte ratos (Wistar, *Rattus norvegicus albinus*), com peso aproximado de 200 g provenientes do Biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os ratos foram agrupados em gaiolas coletivas contendo 5 ratos cada e foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício desta universidade. 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) e baseado no protocolo descrito por MARQUETI et al (2006) levemente modificado.

### 4.1. Grupos Experimentais

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais.

#### *Grupo não treinado (S)*

Os animais denominados não treinados foram assim classificados por não ser imposto à eles nenhuma atividade física, permanecendo durante o período do experimento em suas respectivas gaiolas.

#### *Grupo treinado (T)*

Os animais classificados como treinados foram submetidos a um programa específico de saltos na água.

#### *Grupo não treinado tratado com EAA (SE)*

Os animais deste grupo não foram submetidos a nenhuma atividade física, porém receberam, durante 7 semanas, o tratamento com EAA.

#### *Grupo treinado tratado com EAA (TE)*

Os animais deste grupo foram submetidos ao mesmo programa de exercícios que o grupo T além de receberem o mesmo tratamento com EAA que o grupo SE.

## 4.2. Tratamento com EAA

Os animais receberam decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil, 50 mg/ml). As doses de 5 mg/Kg da massa corporal do rato (dose suprafisiológica) foram injetadas subcutaneamente no dorso do animal, duas vezes por semana, durante 7 semanas. Esta dose foi comparada com a dose frequentemente utilizada por atletas – 600mg/semana ou aproximadamente 8 mg/Kg/semana (POPE;KATZ, 1988). Os grupos que não receberam o EAA (S e T) receberam uma injeção de veículo composto de uma solução contendo óleo de amendoim (1ml) e álcool benzílico (50µl), que é o mesmo veículo do EAA a ser administrado. A dose do veículo a ser aplicada está de acordo com os mesmos critérios dos animais que receberam o EAA.

## 4.3. Protocolo de treinamento

O treinamento consistiu de saltos em um tubo de PVC de 25 cm de diâmetro, objetivando limitar a alternativa do animal em ir para outra direção ou agarrar-se nas bordas para subir, contendo água aquecida a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  até a altura aproximada do dobro do tamanho do animal. O período de treinamento foi de 7 semanas, com 5 sessões de treino por semana. Foi acoplada ao tórax dos animais, através de um colete especial (fig. 10), uma sobrecarga de acordo com o peso do animal. O protocolo está de acordo com o modelo de Cunha et al (2005). A atividade de treino foi desenvolvida de acordo com a descrição a seguir, respeitando o horário do treinamento que foi sempre após as 17:00 horas:



Figura 10. Demonstração do colete usado no treino dos animais (Foto cedida por Rita Marqueti).

- semana pré-treinamento (semana de adaptação dos animais ao exercício, neste período não foi feita administração de EAA): a sobrecarga foi equivalente a 50% do peso do animal, com um número de séries de 2 a 4 e repetições ajustadas de 5 para 10 saltos (fig. 11), tendo um intervalo de repouso entre as séries de 30 segundos.



Figura 11. Animal saltando e depois sendo retirado da água, finalizando a sessão de treinamento (Foto cedida por Rita Marqueti).

-1<sup>a</sup> semana: início do treino com sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal do animal (da 1<sup>a</sup> à 7<sup>a</sup> semana o treino foi composto por 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso (fig. 3) entre as séries).

- 2<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 55% do peso corporal do animal.

- 3<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 60% do peso corporal do animal.

- 4<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 65% do peso corporal do animal.

- 5<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 70% do peso corporal do animal.

- 6<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 75% do peso corporal do animal

7<sup>a</sup> semana: sobrecarga ajustada para 80% do peso corporal do animal.

Todos os animais foram pesados 3x/semana. Todas as sessões ocorreram após as 16 horas. Os pesquisadores observaram todas as sessões de treino.

#### **4.4. Sacrifício dos animais e retirada do músculo**

Depois de 7 semanas de treinamento, imediatamente após a última sessão de treino, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina, porque o sangue foi

usado, por outro participante do projeto, para analisar a enzima conversora da angiotensina (ECA). Em seguida os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas presas e mantidas em extensão, para assim efetuar a retirada do músculo gastrocnêmico das patas posteriores direitas de cada animal. Os músculos foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer – 80°C.

#### **4.5. Extração e controle de qualidade de RNA total**

Amostras de 100mg de tecido foram homogeneizadas com o Power Gen1000 (Fisher Scientific) em TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, California). O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante e por espectrofotometria foi quantificado (260nm) e verificado seu grau de pureza (260nm/280nm). 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).

#### **4.6. 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.

#### **4.7. PCR em tempo real**

A quantificação do RNAm da miostatina, MyoD, Atrogina-1, MURF-1 e de GAPDH de todos os grupos experimentais, foram realizadas em duplicata no termociclador

Rotor Gene 3000 Centrifugal Real-Time (Corbett Research, Mortlake, Austrália). O GAPDH foi usado como gene controle porque foi previamente demonstrado que não varia com o exercício resistido (JEMIOLO;TRAPPE, 2004) e nem com EAA (LEWIS et al., 2007). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para cada gene controle e o GAPDH foi realizada com o reagente SYBR<sup>®</sup> 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 primers da Miostatina, MyoD, Atrogina-1 e MuRF1 usados neste experimento foram gentilmente cedidos pela professora Dra Tânia F. Salvini, da Unidade de Plasticidade Muscular, do Departamento de Fisioterapia da UFSCar.

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 (Tabela 2) e 60 segundos a 72 °C. Um único pico de *melting* foi observado para cada amostra, validando que apenas um produto estava presente (LOUIS et al., 2007) e o tamanho dos amplicons formados foi verificado em gel de agarose 1%. O controle negativo foi feito através de amostras transcritas reversamente sem o MMLV-RT.

*Tabela 2. Informações sobre seqüências de primers e amplicons*

RNAm alvo	Seqüência de primer 5' → 3'	Tamanho do Amplicon, pb	Localização do Amplicon	Ta, °C	NCBI (Seq. de Referência)
Miostatina	F AGTGACGGCTCTTTGGAAGATG R AGTCAGACTCGGTAGGCATGGT	76	307-383	60	AF019624
MyoD	F GGAGACATCCTCAAGCGATGC R GCACCTGGTAAAATCGGATTG	103	1059-1162	52	NM_176079.1
Atrogina-1	F CTAAGGAGCGCCATGGATACT R GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT	91	255-346	56	NM_133521
MURF-1	F TGTCTGGAGGTCGTTTCCG R ATGCCGGTCCATGATCACTT	58	297-355	64	AY059627
GAPDH	F GATGCTGGTCTGAGTATGTCG R GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	196	1108-1304	60	AF106860

F, forward; R, reverse; Ta, temperatura de anelamento; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

A influência do treinamento, do EAA ou a da associação de ambos sobre a expressão gênica do músculo gastrocnêmio foi avaliada pelo método de quantificação relativa. Os dados foram analisados usando a equação de Livak e Schmittgen, onde a variação na expressão de cada gene é igual a  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . O ciclo limiar ( $C_T$ ) indica o número do ciclo onde a reação de amplificação atinge o limiar fixado.  $\Delta C_T$  é o  $C_{T\text{gene alvo}} - C_{T\text{controle}}$  e  $\Delta\Delta C_T$  é o  $\Delta C_T - \text{Média}_{\Delta C_T\text{grupo controle}}$  (LIVAK;SCHMITTGEN, 2001).

#### 4.8. Análise Estatística

Para cada gene, os dados foram verificados para normalidade e variância. Com os dados normais, a variação na expressão do RNAm (valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) entre os grupos foi testada usando Anova *one way*. Quando as médias entre os grupos foram diferentes ( $p < 0,05$ ), a análise *post hoc* (teste Tukey) para múltiplas comparações foi usada. O software de estatística utilizado foi o SigmaStat 2.03. Os dados foram apresentados com média  $\pm$  erro padrão (EP) da média.

## 5. RESULTADOS

Para verificar se o protocolo de treinamento associado ou não com doses supra-fisiológicas de EAA induziu alterações nas vias atróficas e hipertróficas do músculo gastrocnêmio, a expressão gênica da MyoD, miostatina, atrogina-1 e MuRF-1 foi quantificada por PCR em tempo real.

Os resultados obtidos foram considerados como resultados do treinamento, e não efeito da última sessão de treino, já que estudos (LOUIS et al., 2007; PEVIANI et al., 2007) demonstraram que amostras coletadas imediatamente após a última sessão de treino apresentaram os mesmos valores de expressão gênica que amostras coletadas antes da sessão de treino, ou seja, apresentaram a mesma expressão gênica que na condição repouso, pelo menos para os genes estudados neste trabalho.

Os valores das massas musculares do gastrocnêmio também foram normalizados para a massa corporal do animal (massa muscular/massa corporal). Os valores das massas foram obtidos imediatamente após a última sessão de treino. Os resultados são apresentados na tabela 3.

*Massa muscular do gastrocnêmio:* O treinamento, associado ou não com o tratamento com EAA, não promoveu mudanças significativas nas massas musculares do músculo gastrocnêmio normalizadas para a massa corporal do animal.

Tabela 3. Variação do peso muscular normalizado para o peso corporal final entre os diferentes grupos.

Massa muscular (g)/ Massa corporal (g)	Grupos Experimentais			
	S (Média ± EPM)	T (Média ± EPM)	SE (Média ± EPM)	TE (Média ± EPM)
Gastrocnêmio	62,0 ± 1,5	62,0 ± 3,2	61,0 ± 0,8	64,0 ± 1,0

\*Valores são mostrados como Média x 10<sup>-4</sup> ± EPM x 10<sup>-4</sup>, p>0, 05

*Expressão gênica da Miostatina e MyoD.* A interação treinamento e tratamento com EAA reduziu a expressão de miostatina (S x TE; p = 0, 039), mas nem o treinamento, nem o tratamento com EAA, sozinhos, foram capazes de alterar a expressão da miostatina em

relação ao grupo não treinado. Em relação ao grupo treinado, tanto o tratamento com EAA (T x SE;  $p = 0,013$ ) como sua associação com o treinamento (T x TE;  $p = 0,09$ ) reduziu a expressão de miostatina (Fig. 12). Nenhuma alteração no RNAm da MyoD foi observada entre os grupos (Fig. 13).

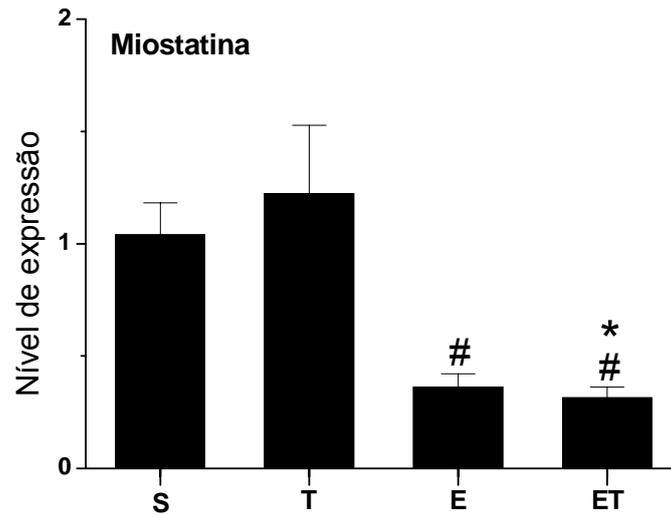


Figura 12. Nível de expressão do RNAm da miostatina no músculo gastrocnêmio ( $n=5$ ), normalizado com GAPDH. Os valores representam a média  $\pm$  EP \* *significativamente diferente de S* ( $p \leq 0,05$ ). # *significativamente diferente de T* ( $p \leq 0,01$ ).

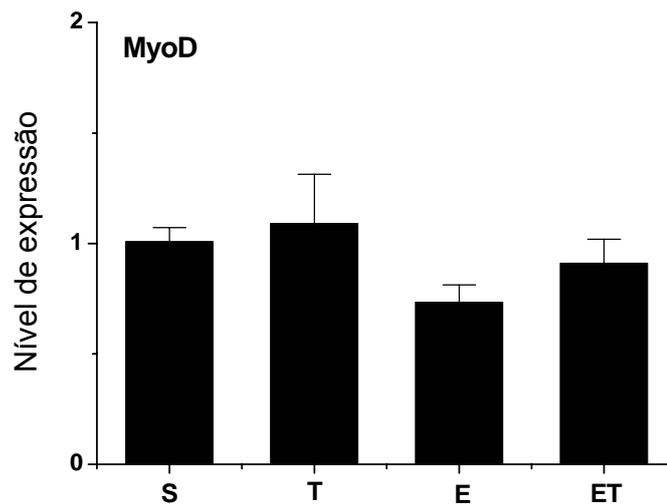


Figura 13. Nível de expressão do RNAm da MyoD no músculo gastrocnêmio ( $n=5$ ), normalizado com o GAPDH. Os valores representam a média  $\pm$  EP

*Expressão gênica da Atrogina-1 e MURF-1.* O treinamento não alterou os níveis de RNAm da atrogina-1, assim como sua associação com o tratamento com EAA. Já o grupo que fez o tratamento com EAA, mas não treinou, expressou mais atrogina-1 que todos os outros grupos (SE x S;  $p < 0,001$ ), (SE x T;  $p < 0,001$ ) e (SE x TE;  $p = 0,025$ ). O grupo que associou o treinamento e o tratamento com EAA expressou mais atrogina-1 que o grupo que só treinou (T x TE;  $p = 0,001$ ) (Fig. 14). Em contraste, a expressão de MuRF-1 não foi alterada em nenhum dos grupos (Fig. 15).

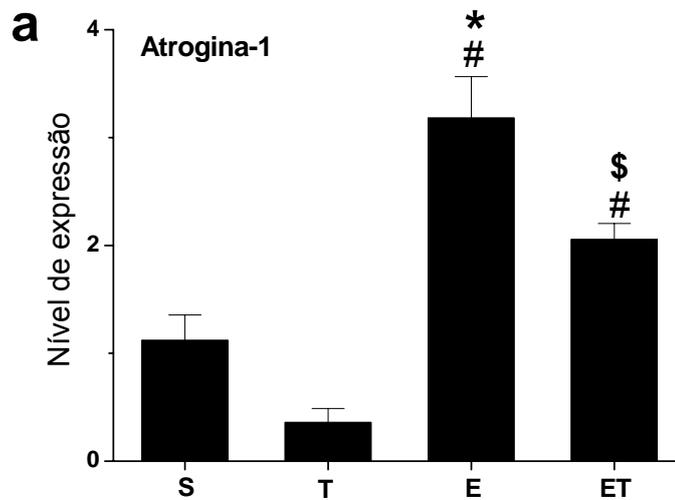


Figura 14. Nível de expressão do RNAm da Atrogina-1 no músculo gastrocnêmio ( $n=5$ ), normalizado com o GAPDH. Os valores representam a média  $\pm$  EP. \* *significativamente diferente de S* ( $p < 0,001$ ). # *significativamente diferente de T* ( $p < 0,001$ ). \$ *significativamente diferente de SE* ( $p \leq 0,05$ )

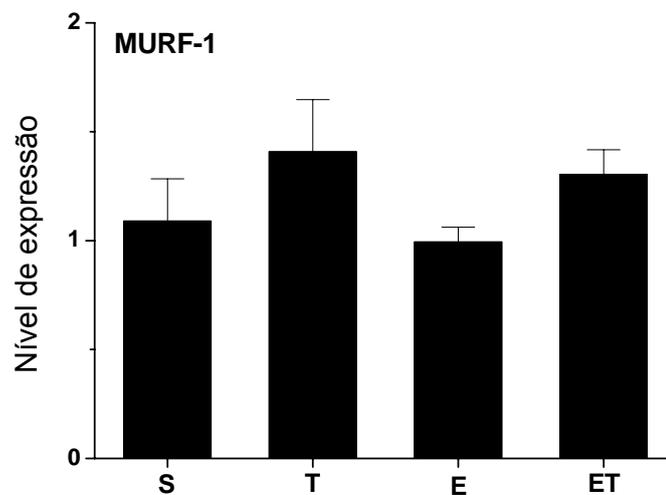


Figura 15. Nível de expressão do RNAm do MuRF-1 no músculo gastrocnêmio ( $n=5$ ), normalizado com o GAPDH. Os valores representam a média  $\pm$  EP.

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nossos resultados demonstraram que o treinamento resistido associado com a administração de doses supra-fisiológicas de EAA reduz a expressão de miostatina e aumenta a expressão do gene relacionado à atrofia muscular, atrogina-1, mas não altera MuRF-1 nem MyoD. A resposta gênica do grupo TE se assemelha mais ao grupo SE que ao grupo T, podendo ser hipotetizado que na interação treinamento e EAA, as respostas obtidas foram predominantes do tratamento com EAA.

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o mesmo modelo de treinamento utilizado neste estudo aumentou o remodelamento da matriz extracelular (MEC) de músculos esqueléticos (MARQUETI, PRESTES, STOTZER et al., 2008) e de tendões (MARQUETI et al., 2006; MARQUETI, PRESTES, PASCHOAL et al., 2008), pois aumentou a atividade de MMP-2, enzima considerada chave em processos de desenvolvimento e remodelamento de tecido ou migração celular (BERNAL; HARTUNG; KIESEIER, 2005).

Entretanto, esses efeitos desejáveis não só foram reduzidos pelo EAA como também foram inibidos na interação treinamento e EAA (MARQUETI et al., 2006; MARQUETI, PRESTES, PASCHOAL et al., 2008; MARQUETI, PRESTES, STOTZER et al., 2008). Resultados similares foram observados na expressão de VEGF, molécula chave na indução da angiogênese (PASCHOAL et al., 2009).

A massa muscular relativa do músculo gastrocnêmio, não foi alterada entre grupos. Porém outras análises são necessárias para determinar, por exemplo, se não houve substituição de massa gorda por massa muscular.

Estudos prévios mostraram que apenas uma sessão de TR é suficiente para alterar os níveis de RNAm. A expressão de miostatina é reduzida (DELDICQUE et al., 2008), enquanto o da MyoD (BICKEL et al., 2005), da Atrogina-1 (LOUIS et al., 2007) e de MuRF-1 (MASCHER et al., 2008) aumentam. Contudo, uma segunda sessão de TR atenua essas alterações na expressão do RNAm (MASCHER et al., 2008).

As respostas gênicas ao treinamento de longa duração (mais de 8 semanas) são conflitantes, uma vez que alguns estudos demonstraram que pode ocorrer redução na expressão de miostatina (WALKER et al., 2004), e aumento na expressão de MyoD (KOSEK et al., 2006), Atrogina-1 e MuRF-1 (LEGER et al., 2006). Contraditoriamente, outros estudos

relataram nenhuma alteração na expressão da miostatina (HULMI et al., 2007; KVORNING et al., 2007), da MyoD (KVORNING et al., 2007) e atrogina-1 (HULMI et al., 2008).

Nossos resultados mostraram que o grupo que treinou não alterou a expressão de nenhum dos genes estudados, em relação ao grupo não treinado. O exercício de longa duração é capaz de promover adaptações na ativação de células satélites e das vias de atrofia (COFFEY;HAWLEY, 2007). O fato do RNAm de nenhum dos genes estudados ter se alterado não significa necessariamente que os níveis de suas proteínas também não se alteraram.

O treinamento proporciona uma maior eficiência na tradução do RNAm (WELLE; BHATT;THORNTON, 1999), podendo ser hipotetizado que depois de 7 semanas de treinamento os ratos apresentem, em resposta ao exercício, uma maior eficiência na síntese de proteína. Outra hipótese é que o treinamento tenha aumentado a expressão basal desses genes, fazendo com que, após cada treino agudo, os níveis de expressão retornem aos seus valores pré-período de treinamento (condição do grupo S), como ocorreu com a expressão da miostatina após um período de TR (WILLOUGHBY, 2004; HULMI et al., 2007; KVORNING et al., 2007).

Recentemente, um estudo em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> mostrou que o EAA estimula a expressão de miostatina (DIEL et al., 2008), mas ao contrário, nosso estudo mostrou que o EAA modula negativamente a expressão de miostatina porque reduz sua expressão tanto no grupo SE (338%) quanto no TE (390%), comparados ao grupo T. Em homens com DPOC, que apresentam um quadro de acentuada perda muscular generalizada, nem o treinamento, nem o EAA e nem a associação de ambos alterou a expressão basal da miostatina (LEWIS et al., 2007).

Como somente células satélites ativadas e não as quiescentes expressam MyoD, esta proteína tem sido um marcador muito usado e bem aceito para identificar células satélites ativadas e em proliferação (LEGERLOTZ;SMITH, 2008). Os EAA ativam células satélites (CHEN; ZAJAC;MACLEAN, 2005; DIEL et al., 2008; KADI, 2008), porém o tratamento com EAA não modulou a expressão de MyoD, nem neste estudo, nem em estudo anterior (MCCLUNG et al., 2005). A supressão da testosterona endógena também não influenciou a expressão de MyoD (KVORNING et al., 2006). Apesar dos EAA agirem ativando as células satélites, a expressão de MyoD parece não ser alterada sob ação dos EAA.

A MyoD, conhecida por induzir proliferação e diferenciação de células satélites, também regula positivamente a transcrição gênica da miostatina, além de ser inibida por esta proteína (BRADLEY; YAWORSKY;WALSH, 2008; FAVIER; BENOIT;FREYSSINET,

2008). A redução na expressão de miostatina promove hipertrofia muscular (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006) estando também associada a aceleração no processo de recuperação e regeneração muscular (WAGNER et al., 2005; HULMI et al., 2007).

Além de ser inibida pela miostatina, a MyoD também pode ser modulada pela Atrogina-1 (TINTIGNAC et al., 2005). Tanto atrogina-1 quanto MURF-1 unem as ubiquitinas à proteína que irá ser degradada pelo proteassomo (COFFEY;HAWLEY, 2007). Essa via, denominada ubiquitina-proteassomo, é o mais importante sistema de degradação de proteínas musculares. Um aumento na atividade dessa via vem sendo considerado necessário tanto em processos de atrofia do músculo esquelético, quanto em processos de adaptações celulares do músculo esquelético (REID, 2005).

Doses fisiológicas de EAA foram eficazes para reduzir a expressão de MuRF-1 e Atrogina-1 em músculo com transecção de nervo, mostrando que o EAA pode prevenir a degradação de proteínas em músculos que já estão em processo catabólico (ZHAO et al., 2008). Por outro lado, uma sessão de TR em músculos destreinados mostrou aumentar a expressão desses genes (LOUIS et al., 2007; DELDICQUE et al., 2008; MASCHER et al., 2008). Já o treinamento de longa duração reduz essa ativação(COFFEY;HAWLEY, 2007).

Um aumento na expressão de Atrogina-1 e de MuRF-1 corresponde a um aumento na quantidade de proteínas ubiquitinadas (ADAMS et al., 2008). Em homens com DPOC, portanto já em processo de degradação muscular, a expressão de Atrogina-1 tende a aumentar só no grupo que associou o TR ao tratamento com EAA, mas não ocorreu no grupo que só recebeu o tratamento com EAA (LEWIS et al., 2007). Demonstramos que o EAA aumentou muito a expressão da Atrogina-1 no grupo SE (284%) e TE (184%), enquanto o treinamento foi eficaz em reduzir o aumento na expressão de atrogina-1 provocado pelo EAA (155%). Porém o EAA não modulou a expressão de MURF-1.

Muito pequeno é o conhecimento em relação às alterações na expressão dessas ubiquitinas de ligação em resposta à carga mecânica do músculo esquelético, com diferenças relativas às diferentes modalidades de sobrecarga muscular, assim como em resposta a repetidas sessões de exercício (NEDERGAARD et al., 2007). Durante muito tempo acreditou-se que a transcrição gênica de ambas ubiquitinas de ligação, atrogina-1 e MuRF-1, estavam sobre o controle do fator de transcrição FOXO1 (SANDRI et al., 2004; GLASS, 2005; SANDRI, 2008). Contudo as diferenças na regulação desses dois genes encontradas em alguns estudos (LOUIS et al., 2007; MASCHER et al., 2008) permaneciam sem explicação.

Evidências recentes sugerem que a regulação da transcrição de atrogina-1 e MuRF-1 está intrinsecamente relacionadas tanto ao estado metabólico celular quanto a

condição inflamatória, através de uma coordenada via de eventos sinalizadores (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008).

Através de camundongos com o I $\kappa$ B Kinase (IkK) ativo constitutivamente, foi possível demonstrar que a ativação do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B promove a elevação do RNAm de MuRF-1, mas não de atrogina-1. (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008). Por outro lado, tanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto a citocina catabólica TNF $\alpha$  foram capazes de induzir a expressão do RNAm da atrogina-1 no músculo via p38MAPK (LI et al., 2005). Juntas, essas descobertas mostram que a regulação da transcrição da atrogina-1 e MuRF-1 são sensíveis a mediadores inflamatórios locais (TNF $\alpha$ ) e a própria via inflamatória NF- $\kappa$ B. Além disso, elas mostram que atrogina-1 e MuRF-1 podem funcionar independentemente uma da outra (MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008).

A proteína p38 é um importante membro da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que é ativada em resposta a vários tipos de estresse fisiológico, como estresse osmótico, endotoxinas e estresse oxidativo (POWERS; KAVAZIS; MCCLUNG, 2007). Um aumento na expressão de atrogina-1 somente nos grupos que receberam o EAA pode sugerir que o tratamento com EAA desencadeia um estresse fisiológico, que possui uma importante função em ativar o TNF $\alpha$  ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que vai ativar a proteína p38, acarretando em uma maior atrofia muscular.

A complexa ação coordenada entre os genes pesquisados neste trabalho e descritos em estudos anteriores pode ser observada na fig.16. Entretanto, no presente estudo, os EAA parecem ativar uma via independente de ação desses genes. A redução na expressão de miostatina aparentemente não promoveu o esperado aumento na ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, uma vez que a MyoD não se alterou.

Como os mesmos grupos que tiveram a expressão da miostatina reduzida tiveram aumento na expressão de atrogina-1, pode se supor que a Atrogina-1 ubiquitinou e degradou a MyoD (TINTIGNAC et al., 2005) nesses grupos, o que teria interrompido a progressão do ciclo celular que teoricamente teve início em resposta a redução da miostatina.

Possíveis limitações do estudo: Infelizmente faltam dados, como análise histológica e expressão protéica, que possam mostrar os resultados da alteração na expressão gênica no músculo esquelético, promovida pelo EAA. Sem estes dados, é difícil concluir se os eventos que ocorreram favoreceram o remodelamento ou a atrofia muscular.

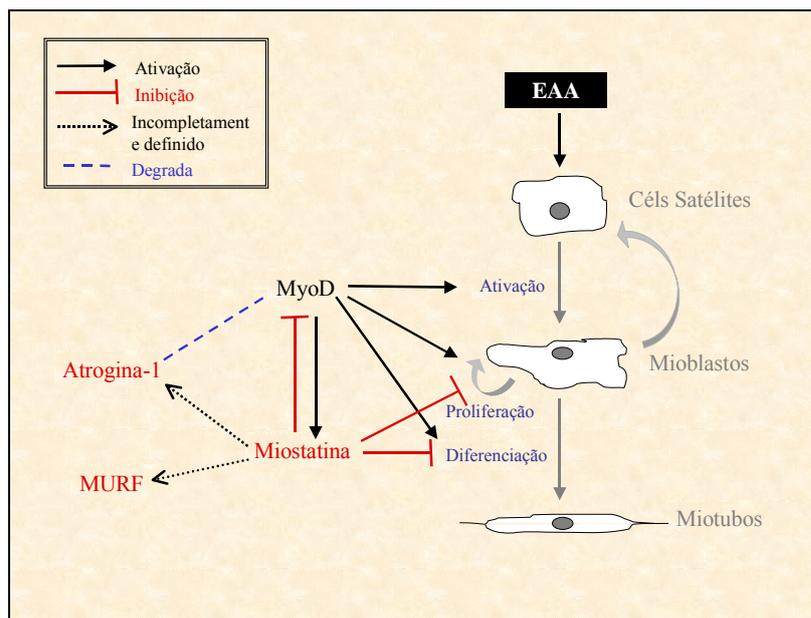


Figura 16. Possíveis interações entre os EAA e MyoD, Miostatina, Atrogina-1 e MURF-1. Os EAA agem ativando células satélites quiescentes (KADI, 2008). Para que ocorra a proliferação e a diferenciação dessas células ativadas, a MyoD é requerida (LEGERLOTZ;SMITH, 2008). A MyoD regula positivamente a transcrição gênica de miostatina durante a maturação do miócito (BRADLEY; YAWORSKY;WALSH, 2008). A miostatina é uma proteína que inibe o crescimento do músculo esquelético (JOULIA-EKAZA;CABELLO, 2006) por inibir a expressão de MyoD, o que inibe a ativação de células satélites (BRADLEY; YAWORSKY;WALSH, 2008). Parece que a miostatina aumenta a atividade da família FOXO de fatores de transcrição, que é necessário para aumentar a expressão de Atrogina-1 e MuRF-1 (FAVIER; BENOIT;FREYSSENET, 2008). A resposta do treinamento físico sobre essas vias permanece incerta

Porém a massa final do gastrocnêmio, relativa à massa total do animal, não foi alterada em nenhum dos grupos. Também é relevante lembrar que o remodelamento da MEC de músculos esqueléticos e tendões foram inibidos, tanto pelo tratamento com EAA quanto pela sua associação com o treinamento (MARQUETI et al., 2006; MARQUETI, PRESTES, PASCHOAL et al., 2008; MARQUETI, PRESTES, STOTZER et al., 2008). Além disso, em músculos sóleo sobrecarregados funcionalmente, o aumento no remodelamento foi inibido na interação com EAA (MCCLUNG et al., 2005). Esses resultados sugerem que o uso prolongado de EAA pode ser prejudicial para o remodelamento muscular, além de aumentar a razão de atrofia muscular.

Os EAA podem ser benéficos em situações adversas da saúde, e doses fisiológicas nessas situações podem reverter, por exemplo, processos de atrofia do músculo esquelético (ZHAO et al., 2008). Por outro lado os EAA, quando utilizados em doses supra-fisiológicas, com a finalidade de melhorar o desempenho esportivo ou a aparência podem produzir diversos e severos efeitos indesejados, dos psicológicos: agressividade, hostilidade (TALIH; FATTAL;MALONE, 2007) ansiedade (ROCHA et al., 2007); aos fisiológicos: acidente vascular cerebral, hipertensão, infertilidade, entre diversos outros

(CALFEE;FADALE, 2006), inclusive musculares, como remodelamento prejudicado de tendões (MARQUETI et al., 2006; MARQUETI, PRESTES, PASCHOAL et al., 2008), músculos esqueléticos (MARQUETI, PRESTES, STOTZER et al., 2008) e prejuízo na angiogênese (PASCHOAL et al., 2009), o que pode prejudicar, a médio e longo prazo, o desempenho atlético.

Conjuntamente, nossos resultados demonstram claramente que a administração de doses suprafsiológicas do EAA decanoato de nandrolona é suficiente para alterar as respostas ao treinamento resistido em relação à expressão gênica da miostatina e atrogina-1, porém sem afetar a expressão dos genes MyoD e MuRF-1. Em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, o EAA estimulou a proliferação e acelerou o processo de diferenciação de mioblastos em miotubos, apesar de estimular a expressão da miostatina (DIEL et al., 2008), enquanto em ratos, o EAA altera a expressão gênica do músculo esquelético, aparentemente impedindo as células satélites de saírem do ciclo celular (MCCLUNG et al., 2005). Ainda não se conhecem as consequências a longo prazo do (ab)uso de doses suprafsiológicas de AAS que podem ocorrer em consequência do intenso recrutamento dessas vias.

Nosso estudo proveu novas informações a respeito do comportamento de genes relacionados tanto a progressão do ciclo celular quanto a ativação de vias de degradação proteica em músculos que não estão em processo de atrofia e que foram submetidos a um programa de treinamento resistido de alta intensidade juntamente com doses suprafsiológicas de EAA semelhantes às usadas por atletas de elite.

## 7. CONCLUSÕES

O esteróide anabólico androgênico decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®, Organon do Brasil, São Paulo, Brasil, 50 mg/ml), quando administrado em doses de 5 mg/Kg da massa corporal do rato (dose suprafisiológica), subcutaneamente, duas vezes por semana, durante 7 semanas:

- Aumenta a expressão de Atrogina-1, uma E3 de ligação que marca proteínas para serem degradadas.

Quando associamos este tratamento com exercício de salto com sobrecarga, praticado cinco vezes por semana, durante sete semanas:

- Observamos uma redução na expressão de miostatina, uma proteína que impede a progressão do ciclo celular;
- Porém a expressão de MyoD, proteína necessária para a progressão do ciclo celular, não apresentou um aumento concomitante com a redução da miostatina;
- Provavelmente a MyoD foi degradada pela alta expressão de atrogina-1.

Conjuntamente, esses resultados sugerem que o tratamento com EAA, associado ou não com o treinamento, não facilita a progressão do ciclo celular. Ao contrário, aumentou a ativação da via ubiquitina-proteassomo de degradação proteica no músculo esquelético.

Porém mais estudos e análises são necessários para determinar os resultados dessas alterações no músculo esquelético, como o tamanho final das fibras musculares, a quantidade de massa magra em relação à massa gorda, a força muscular e a qualidade do músculo.

## 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, V. et al. Modulation of Murf-1 and MAFbx expression in the myocardium by physical exercise training. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v.15, n.3, p.293-9. 2008.

AGUILERA, R. et al. Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios. **Clin Chem**, v.47, n.2, p.292-300. 2001.

American College of Sports Medicine position stand on the use of anabolic-androgenic steroids in sports. **Med Sci Sports Exerc**, v.19, n.5, p.534-9. 1987.

ARMSTRONG, R. B. ; M. H. LAUGHLIN. Metabolic indicators of fibre recruitment in mammalian muscles during locomotion. **J Exp Biol**, v.115, p.201-13. 1985.

BAAR, K.; G. NADER ; S. BODINE. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. **Essays Biochem**, v.42, p.61-74. 2006.

BAHRKE, M. S. ; C. E. YESALIS. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Curr Opin Pharmacol**, v.4, n.6, p.614-20. 2004.

BARCLAY, C. J. ; C. L. WEBER. Slow skeletal muscles of the mouse have greater initial efficiency than fast muscles but the same net efficiency. **J Physiol**, v.559, n.Pt 2, p.519-33. 2004.

BASARIA, S.; J. T. WAHLSTROM ; A. S. DOBS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.11, p.5108-17. 2001.

BASSEL-DUBY, R. ; E. N. OLSON. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**, v.75, p.19-37. 2006.

BERNAL, F.; H. P. HARTUNG ; B. C. KIESEIER. Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. **Biol Res**, v.38, n.2-3, p.267-71. 2005.

BICKEL, C. S. et al. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol**, v.98, n.2, p.482-8. 2005.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v.294, n.5547, p.1704-8. 2001.

BRADLEY, L.; P. J. YAWORSKY ; F. S. WALSH. Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease. **Cell Mol Life Sci**, v.65, n.14, p.2119-24. 2008.

BROOKS, S. V. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. **Adv Physiol Educ**, v.27, n.1-4, p.171-82. 2003.

CALFEE, R. ; P. FADALE. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. **Pediatrics**, v.117, n.3, p.e577-89. 2006.

CARMELI, E. et al. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v.29, n.2, p.191-7. 2004.

CHEN, Y.; J. D. ZAJAC ; H. E. MACLEAN. Androgen regulation of satellite cell function. **J Endocrinol**, v.186, n.1, p.21-31. 2005.

CLARK, A. S. ; L. P. HENDERSON. Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. **Neurosci Biobehav Rev**, v.27, n.5, p.413-36. 2003.

COFFEY, V. G. ; J. A. HAWLEY. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med**, v.37, n.9, p.737-63. 2007.

CUNHA, T. S. et al. A Administração de Nandrolona Não Promove Hipertrofia do Músculo Sóleo em Ratos. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.50, n.3, p.9. 2006.

DELDICQUE, L. et al. Effects of resistance exercise with and without creatine supplementation on gene expression and cell signaling in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.104, n.2, p.371-8. 2008.

DIEL, P. et al. C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and Pax7 expression. **J Mol Endocrinol**, v.40, n.5, p.231-41. 2008.

ESTRADA, M.; A. VARSHNEY ; B. E. EHRLICH. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. **J Biol Chem**, v.281, n.35, p.25492-501. 2006.

FAVIER, F. B.; H. BENOIT ; D. FREYSSENET. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Arch**, v.456, n.3, p.587-600. 2008.

GAYTON, A. C. ; J. E. HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2002. 973 pags.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, n.10, p.1974-84. 2005.

GOLDSPINK, G. Cellular and molecular aspects of muscle growth, adaptation and ageing. **Gerodontology**, v.15, n.1, p.35-43. 1998.

GUNNING, P. ; E. HARDEMAN. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. **Faseb J**, v.5, n.15, p.3064-70. 1991.

HARRIDGE, S. D. R. Responses and Adaptations of skeletal muscle to hormones and drugs. In: R. BOTTINELLI; C. REGGIANI (Ed.). **Skeletal Muscle Plasticity in Health and Disease**. London: Springer, 2006. p.289-314.

HULMI, J. J. et al. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. **Med Sci Sports Exerc**, v.39, n.2, p.289-97. 2007.

HULMI, J. J. et al. Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. **Amino Acids**. 2008.

JEMIOLO, B. ; S. TRAPPE. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, v.320, n.3, p.1043-50. 2004.

JOULIA-EKAZA, D. ; G. CABELLO. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. **Exp Cell Res**, v.312, n.13, p.2401-14. 2006.

KADI, F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. **Br J Pharmacol**, v.154, n.3, p.522-8. 2008.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br J Pharmacol**, v.154, n.3, p.502-21. 2008.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol Rev**, v.84, n.2, p.649-98. 2004.

KOSEK, D. J. et al. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. **J Appl Physiol**, v.101, n.2, p.531-44. 2006.

KVORNING, T. et al. Suppression of endogenous testosterone production attenuates the response to strength training: a randomized, placebo-controlled, and blinded intervention study. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.291, n.6, p.E1325-32. 2006.

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**, v.578, n.Pt 2, p.579-93. 2007.

LANGLEY, B. et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **J Biol Chem**, v.277, n.51, p.49831-40. 2002.

LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.20, p.61-86. 2004.

LEGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**, v.576, n.Pt 3, p.923-33. 2006.

LEGERLOTZ, K. ; H. K. SMITH. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. **Muscle Nerve**, v.38, n.3, p.1087-100. 2008.

LEWIS, M. I. et al. Skeletal muscle adaptations to testosterone and resistance training in men with COPD. **J Appl Physiol**, v.103, n.4, p.1299-310. 2007.

LI, Y. P. et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **Faseb J**, v.19, n.3, p.362-70. 2005.

LIEBER, R. L. Skeletal Muscle Structure and Function. Implications for Rehabilitation and Sports Medicine. Maryland USA: Williams & Wilkins. 1992.

LIVAK, K. J. ; T. D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8. 2001.

LODISH H et al. **Biologia celular e molecular**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 1054 pags.

LOUIS, E. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.103, n.5, p.1744-51. 2007.

MARIEB, E. N. ; K. HOEHN. **Human Anatomy & Physiology**: Pearson. 2007. 1296 pags.

MARKOVIC, G. Does plyometric training improve vertical jump height? A meta-analytical review. **Br J Sports Med**, v.41, n.6, p.349-55; discussion 355. 2007.

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. **Am J Sports Med**, v.34, n.8, p.1274-80. 2006.

MARQUETI, R. C. et al. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**. 2008.

MARQUETI, R. C. et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, v.29, n.7, p.559-63. 2008.

MARTEL, G. F. et al. Aquatic plyometric training increases vertical jump in female volleyball players. **Med Sci Sports Exerc**, v.37, n.10, p.1814-9. 2005.

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**, v.294, n.1, p.E43-51. 2008.

MASEK, T. et al. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Anal Biochem**, v.336, n.1, p.46-50. 2005.

MATSAKAS, A. ; P. DIEHL. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. **Int J Sports Med**, v.26, n.2, p.83-9. 2005.

MCCLUNG, J. M. et al. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.288, n.6, p.R1543-52. 2005.

MCFARLANE, C.; M. SHARMA ; R. KAMBADUR. Myostatin is a procachectic growth factor during postnatal myogenesis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.11, n.4, p.422-7. 2008.

MCPHERRON, A. C. ; S. J. LEE. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.23, p.12457-61. 1997.

MITCH, W. E. ; A. L. GOLDBERG. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. **N Engl J Med**, v.335, n.25, p.1897-905. 1996.

MOTTRAM, D. R. ; A. J. GEORGE. Anabolic steroids. **Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.14, n.1, p.55-69. 2000.

MURTON, A. J.; D. CONSTANTIN ; P. L. GREENHAFF. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochim Biophys Acta**, v.1782, n.12, p.730-43. 2008.

NADER, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, n.10, p.1985-96. 2005.

NEDERGAARD, A. et al. Expression patterns of atrogenic and ubiquitin proteasome component genes with exercise: effect of different loading patterns and repeated exercise bouts. **J Appl Physiol**, v.103, n.5, p.1513-22. 2007.

OKADA, A. et al. Decreased muscle atrophy F-box (MAFbx) expression in regenerating muscle after muscle-damaging exercise. **Muscle Nerve**, v.38, n.4, p.1246-53. 2008.

PASCHOAL, M. et al. Nandrolone inhibits VEGF mRNA in rat muscle. **Int J Sports Med**, v.30, n.11, p.775-8. 2009.

PEVIANI, S. M. et al. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, v.35, n.3, p.363-70. 2007.

POPE, H. G., JR. ; D. L. KATZ. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. **Am J Psychiatry**, v.145, n.4, p.487-90. 1988.

POWERS, S. K.; A. N. KAVAZIS ; J. M. MCCLUNG. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **J Appl Physiol**, v.102, n.6, p.2389-97. 2007.

RAUE, U. et al. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. **J Appl Physiol**, v.101, n.1, p.53-9. 2006.

REID, M. B. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.288, n.6, p.R1423-31. 2005.

REINSTEIN, E. ; A. CIECHANOVER. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. **Ann Intern Med**, v.145, n.9, p.676-84. 2006.

ROCHA, V. M. et al. Influence of anabolic steroid on anxiety levels in sedentary male rats. **Stress**, v.10, n.4, p.326-31. 2007.

SAHRAIAN, M. A. et al. Androgen-induced cerebral venous sinus thrombosis in a young body builder: case report. **BMC Neurol**, v.4, n.1, p.22. 2004.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda)**, v.23, p.160-70. 2008.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v.117, n.3, p.399-412. 2004.

SHARMA, M. et al. Myostatin in muscle growth and repair. **Exerc Sport Sci Rev**, v.29, n.4, p.155-8. 2001.

STARON, K. et al. Sensitivity to inhibitors of type II topoisomerases from mouse L5178Y lymphoma strains that are resistant or sensitive to X-radiation. **Mutat Res**, v.285, n.2, p.175-9. 1993.

STEWART, C. E. ; J. RITTWEGGER. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.6, n.1, p.73-86. 2006.

TALIH, F.; O. FATTAL ; D. MALONE, JR. Anabolic steroid abuse: psychiatric and physical costs. **Cleve Clin J Med**, v.74, n.5, p.341-4, 346, 349-52. 2007.

TAMAKI, T. et al. Anabolic-androgenic steroid does not enhance compensatory muscle hypertrophy but significantly diminish muscle damages in the rat surgical ablation model. **Histochem Cell Biol**, v.132, n.1, p.71-81. 2009.

THOMAS, M. et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J Biol Chem**, v.275, n.51, p.40235-43. 2000.

TINTIGNAC, L. A. et al. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v.280, n.4, p.2847-56. 2005.

TOIGO, M. ; U. BOUTELLIER. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **Eur J Appl Physiol**, v.97, n.6, p.643-63. 2006.

TSUCHIDA, K. Activins, myostatin and related TGF-beta family members as novel therapeutic targets for endocrine, metabolic and immune disorders. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, v.4, n.2, p.157-66. 2004.

VENTADOUR, S. ; D. ATTAIX. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. **Curr Opin Rheumatol**, v.18, n.6, p.631-5. 2006.

VOGEL, G. A race to the starting line. **Science**, v.305, n.5684, p.632-5. 2004.

WAGNER, K. R. et al. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.7, p.2519-24. 2005.

WALKER, K. S. et al. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.5, p.787-93. 2004.

WARBURTON, D. E.; C. W. NICOL ; S. S. BREDIN. Health benefits of physical activity: the evidence. **Cmaj**, v.174, n.6, p.801-9. 2006a.

WARBURTON, D. E.; C. W. NICOL ; S. S. BREDIN. Prescribing exercise as preventive therapy. **Cmaj**, v.174, n.7, p.961-74. 2006b.

WELLE, S.; K. BHATT ; C. A. THORNTON. Stimulation of myofibrillar synthesis by exercise is mediated by more efficient translation of mRNA. **J Appl Physiol**, v.86, n.4, p.1220-5. 1999.

WHITTEMORE, L. A. et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochem Biophys Res Commun**, v.300, n.4, p.965-71. 2003.

WILLOUGHBY, D. S. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.4, p.574-82. 2004.

ZHAO, J. et al. Effects of nandrolone on denervation atrophy depend upon time after nerve transection. **Muscle Nerve**, v.37, n.1, p.42-9. 2008.