

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NADROLONA NA  
VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO, ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO EM  
CÉLULAS MUSCULARES C2C12**

**ELISANGELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA**

**São Paulo, SP  
2010**

**ELISANGELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NADROLONA NA  
VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO, ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO EM  
CÉLULAS MUSCULARES C2C12**

Dissertação apresentada à  
Universidade Nove de Julho,  
para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da  
Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari  
Co-orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

**São Paulo, SP  
2010**

## FICHA CATALOGRAFICA

Oliveira, Elisangela Nascimento.

Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na viabilidade, proliferação, adesão e diferenciação em células musculares C2C12 / Elisangela Nascimento de Oliveira. 2010.

64 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2010.

Orientador (a): Prof. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

1.Decanoato de Nandrolona. 2.Mioblastos. 3.Proliferação. 4.Adesão.  
5.Diferenciação.

CDU 615.8

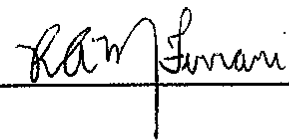
São Paulo, 15 de dezembro de 2010.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: ELISÂNGELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

Título da Dissertação: "EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO, ADESÃO E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS MUSCULARES C2C12".

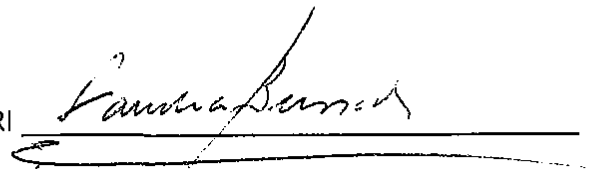
Presidente PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. ANA CLÁUDIA MUNIZ RENNO



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo **Claudio**, por todo carinho, amor e paciência que sempre teve comigo, e pelo constante incentivo para o meu aprimoramento.

Aos meus pais **Egídio e Fatima**, que sempre me apoiaram em meus estudos e que sempre me deram amor e carinho incondicionais.

Muito obrigado a vocês que torceram pela realização de mais este sonho.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** que sempre me ilumina, me dá sabedoria e me mostra os caminhos corretos que devo trilhar para que eu possa seguir na estrada certa, pois sem sua intercessão direta em minha vida nada seria possível.

Aos meus sogros Sr. Claudio e Dna Neiva, meu irmão Kleber, meus cunhados Fernanda e João, aos amigos e a todos àqueles que sempre torcerem por mim.

Aos meus pacientes por compreenderem minhas alterações nos horários de atendimento, facilitando meus compromissos no laboratório.

À minha orientadora **Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari**, excelente professora e excelente pessoa, a quem agradeço por toda paciência, calma, sabedoria e cordialidade com que me ensinou muito ao longo deste período.

À minha co-orientadora e amiga **Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes**, a quem devo a minha gratidão por me dar a oportunidade de trilhar novos caminhos descobrindo a pesquisa.

À Profa. Sandra Kalil Bussadori e ao Prof. José Antonio Silva Junior, que me ajudaram em etapas importantes deste trabalho.

A todos os demais professores que tive oportunidade de conviver ao longo de todo curso, pela constante contribuição nos conhecimentos da ciência. Obrigada pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo.

Aos colegas de laboratório, entre eles alunos da iniciação científica e do mestrado que colaboraram, cada um à sua forma para o meu aprendizado e para a realização deste trabalho. Aos técnicos do laboratório de pesquisa, em especial a Tábata de Oliveira, por toda sua fundamental colaboração.

Ao amigo e companheiro de mestrado Rafael Ribeiro que mesmo de longe sempre esteve à disposição para me ajudar em todas as etapas deste trabalho.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação pela ajuda constante.

Ao **Prof. Dr. José Ernesto Belizário**, da Universidade de São Paulo, pela doação das células C2C12 que propiciaram todo esse estudo.

## RESUMO

Estudos apontam que o anabolizante decanoato de nandrolona modula a regulação do ciclo celular, porém pouco se conhece sobre seus efeitos nas células musculares. Assim, o objetivo foi avaliar o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na proliferação, adesão e diferenciação das células musculares C2C12. As células foram cultivadas em meio regular, 10% de soro fetal bovino (SFB) e em carência nutricional (5% SFB) e incubadas com o anabolizante/veículo nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M. O grupo controle não recebeu tratamento. A proliferação celular foi avaliada em 24, 48 e 72h (curto prazo) e em 3 e 5 dias (longo prazo), e a adesão celular em 20, 40 e 60 min, utilizando o método MTT. A expressão dos marcadores miogênicos foi avaliada após 2, 4 e 8h utilizando o PCR em tempo real. Os resultados mostraram que o decanoato de nandrolona não induziu alterações significativas na proliferação celular em curto prazo e na adesão. Em longo prazo após 5 dias houve um aumento estatisticamente significativo na proliferação das células tratadas com anabolizante a 5 $\mu$ M quando cultivadas em meio regular e 25 $\mu$ M na situação de simulação de lesão, com relação às demais concentrações e ao controle. Além disso, após 8 horas da incubação as células C2C12 apresentaram um aumento na expressão da miogenina em comparação aos demais períodos enquanto que a expressão de MyoD não sofreu alteração nos períodos e grupos avaliados, não havendo diferenças entre os grupos tratados e controle. Conclusão: o anabolizante decanoato de nandrolona induziu um aumento na proliferação celular após 5 dias de forma dose-dependente, porém não interferiu na adesão celular e expressão de marcadores miogênicos.

**Palavras-chave:** Decanoato de nandrolona; Mioblastos; Proliferação; Adesão; Diferenciação.



## ABSTRACT

Studies indicate that the anabolic nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation, but little is known about its effects on muscle cells. The aim of this study was to evaluate the effect of anabolic nandrolone decanoate on proliferation, adhesion and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells. The cells were cultured in a regular, 10% fetal bovine serum (FBS) and simulation of nutritional deficiency (5% FBS) and incubated with the steroid / vehicle at concentrations of 5, 10, 25 and 50 $\mu$ M. The control group did not receive the treatment. Cell proliferation was assessed in 24, 48 and 72 (short term) and 3 and 5 days (long-term), and the adhesion in 20, 40 and 60 min, using the MTT assay. The myogenic markers expression was assessed after 2, 4 and 8 hours using real time PCR. The results show that nandrolone decanoate did not induce significant changes in cell proliferation in short-term adherence. In the long term after 5 days there was a statistically significant increase in proliferation of cells treated with the anabolic 5 $\mu$ M when cultured in a regular situation and 25 $\mu$ M in simulation of injury, compared with the other concentrations and control. Furthermore, after 8 hours incubation, C2C12 cells showed an increased expression of myogenin in comparison to other periods while MyoD did not change during periods and study groups, no differences between the treated and control groups. Conclusion: The anabolic steroid nandrolone induced an increase in cell proliferation after five days in a dose-dependent but did not interfere in the adhesion and expression of myogenic markers.

**Keywords:** Nandrolone decanoate; Myoblasts; Proliferation; Adhesion; Differentiation

# SUMÁRIO

<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	14
<b>2. ESTUDO 1: “Efeitos do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a proliferação e adesão de células musculares”</b> .....	20
Resumo .....	21
Introdução .....	23
Metodologia.....	25
Resultados .....	27
Discussão .....	30
Referências Bibliográficas .....	34
<b>3. ESTUDO 2: “Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na expressão de marcadores miogênicos e proliferação das células musculares em longo prazo”</b> .....	37
Resumo.....	38
Introdução .....	40
Material e métodos .....	41
Resultados .....	45
Discussão .....	49
Referências Bibliográficas .....	53
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63
<b>ANEXO 1: Protocolo de submissão dos artigos para publicação à Revista Brasileira de Fisioterapia</b> .....	63
<b>ANEXO 2: Protocolo de submissão dos artigos para publicação à Revista Brasileira de Fisioterapia</b> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

### Estudo 1

Figura 1. Avaliação da proliferação e viabilidade celular mensurada como absorbância (DO620nm) pelo MTT das culturas de células musculares cultivadas em situação de carência nutricional (simulação de lesão - 5% de SFB) por 24, 48 e 72h, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ou somente com o veículo da droga adicionado em diferentes quantidades de acordo com as respectivas concentrações avaliadas do anabolizante.....28

Figura 2. Avaliação da proliferação e viabilidade celular mensurada como absorbância (DO620nm) pelo MTT das culturas de células musculares cultivadas em situação em meio regular (10% de SFB) por 24, 48 e 72h, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ou somente com o veículo da droga.....29

Figura 3. Avaliação da adesão das células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações.....30

### Estudo 2

Figura 1. Análise da expressão gênica MyoD nas células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona na concentração de 5  $\mu$ M, após 2, 4 e 8h de incubação.....46

Figura 2. Análise da expressão gênica miogenina nas células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante Deca-Durabolin na concentração de 5  $\mu$ M, após 2, 4 e 8h de incubação. A mesma letra denota diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ /ANOVA Tukey).....47

Figura 3. Avaliação da proliferação em longo prazo das células musculares cultivadas em situação de carência nutricional (simulação de lesão - 5% de SFB) por 3 e 5 dias, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ( $p \leq 0,05$ ).....48

Figura 4. Avaliação da proliferação em longo prazo viabilidade das células musculares cultivadas em situação em meio regular (10% de SFB) por 3 e 5 dias, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ( $p \leq 0,05$ ).....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Anabolic androgen steroids  
AR – Receptor androgênico  
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar  
DEPC - Dietilpirocarbonato  
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
DNase – Desoxirribonuclease  
GAPDH- Gliceraldeído desidrogenase  
HIV – Human imunodeficiency vírus  
KCl – Cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO – Fosfato monoácido do potássio  
M – Mol  
M-MLV – Enzima Transcriptase Reversa  
MMPs – Metaloproteinase da matriz  
MRFs - Fatores miogênicos regulatórios  
MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue  
NaCl – Cloreto de sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato monoácido de sódio  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PBS – Phosphatase-buffered saline (solução tampão fosfato salina)  
RNA - Ácido ribonucleico  
RNase – Ribonuclease  
SFB – Soro fetal bovino  
µl - Microlitro  
µM – Micromol  
mM - Milimol  
ng - Nanogramas  
nm – Nanômetros  
µm – Micrômetros  
µg – Microgramas  
ml – Mililitros

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O músculo esquelético possui grande habilidade de adaptação a situações fisiológicas incluindo treinamento, crescimento pós-natal, alongamento entre outros, e frente à lesão após um trauma direto (como por exemplo, lacerações e contusões) ou devido a causas indiretas como isquemia e disfunção neurológica<sup>1-3</sup>.

A lesão muscular, comum entre os atletas e pacientes, exige respostas fisiológicas de modo a controlar a inflamação do tecido. Para que ocorra uma regeneração eficiente e rápida, os eventos envolvendo a resposta celular tem sido investigada com o objetivo de entender o mecanismo de sinalização desta recuperação e quais fatores influenciam para que a célula responda adequadamente de modo a repor a fibra lesada.

Após uma lesão muscular um conjunto finamente orquestrado de respostas celulares é ativado, resultando em uma regeneração adequada deste tecido e conseqüentemente em um músculo bem inervado, vascularizado e com um aparelho contrátil íntegro<sup>2</sup>. Como as fibras musculares esqueléticas adultas são bem diferenciadas, a capacidade para esta resposta regenerativa deve-se principalmente a uma população de células mononucleadas denominadas células satélites localizadas abaixo da lâmina basal das fibras musculares, que se tornam ativas após serem estimuladas. As células satélites ativadas passam a ser chamadas de mioblastos que proliferam, posteriormente se fundem para formar miotubos e por fim se diferenciam para fundirem-se a fibra pré existente ou constituir uma nova fibra muscular, de forma a repor a lesionada<sup>3-13</sup>.

Durante este processo de proliferação e diferenciação, ou seja, miogênese, as células satélites passam a expressar vários fatores transcricionais, entre eles, os fatores miogênicos reguladores (MRFs) tais como MyoD, Myf5, miogenina e MRF4<sup>6,9,14</sup>. A expressão ordenada dos marcadores nas células miogênicas cultivadas C2C12 é muito semelhante a aquela observada durante a miogênese *in vivo*. Desta forma, a linhagem celular mioblástica (C2) proveniente de camundongos e seus subclones (C2C12) serve como modelo bem aceito para os estudos da miogênese *in vitro*<sup>15,16</sup>.

O processo da miogênese pode ser dividido em duas fases: determinação e diferenciação. A determinação é o evento em que as células satélites pluripotentes, que estão se multiplicando, são mobilizadas para o processo miogênico, transformando-se em mioblastos. A diferenciação ocorre quando os genes dos miotúbulos iniciam sua expressão músculo-específica, e então os mioblastos param de se multiplicar, e as fibras musculares passam a crescer quase que somente em volume<sup>17,18</sup>. Os mioblastos que expressam Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, genes que regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares multinucleadas, tornando o músculo esquelético um tecido estável<sup>19</sup>.

O MyoD marca a ativação das células satélites (proliferação), encontrado em níveis elevados no músculo em processo de regeneração, juntamente com outras proteínas relacionadas a diferenciação de células da linhagem miogênica. Durante as fases do ciclo celular, o MyoD apresenta-se em níveis altos durante a fase que corresponde ao crescimento e preparação para a replicação dos cromossomos, expresso nos estágios iniciais da diferenciação, caindo para níveis mais baixos nos estágios finais da diferenciação<sup>7</sup>. A miogenina representa um importante fator miogênico regulador sendo expressa durante a fase na qual os mioblastos se fundem para formarem miotubos, marcando desta forma o início da diferenciação<sup>20</sup>.

A resposta de crescimento celular com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético parece exigir a integração de vários estímulos de sinalização incluindo o fator hormonal<sup>21</sup>.

Os hormônios esteróides anabolizantes (“anabolic-androgen steroids” - AAS) pertencem à classe dos hormônios sexuais masculinos sendo promotores e mantenedores das características sexuais associadas a masculinidade<sup>22,23</sup>.

A indicação terapêutica para o uso de AAS está associada a quadros de osteoporose, anemia, carcinoma mamário, sarcopenia associado à doença pulmonar obstrutiva crônica, no tratamento de baixa estatura, a quadros relacionados ao HIV e em pacientes hipogonadais<sup>22-33</sup>.

Os efeitos anabólicos sobre o músculo esquelético têm sido uma fonte de muita controvérsia por mais de 6 décadas<sup>34</sup>, e nos últimos 40 anos seu uso tornou-se muito generalizado<sup>35</sup>, no entanto uma série de estudos relatam que a

suplementação da testosterona aumenta o número de células satélites em homens e roedores e que a massa muscular esquelética em homens pode ser aumentada, mas os mecanismos pelos quais a testosterona obtém essa resposta ainda são mal compreendidos<sup>21,23,27,36</sup>.

Acredita-se que as células satélites apresentam um receptor para andrógenos, mas os mecanismos de regulação não são claros<sup>23</sup>. A grande diversidade na ação do andrógeno se dá pela resposta aos diferentes alvos, todavia esta ação é mediada por uma única espécie de receptor<sup>23,35,37,38</sup>. Este receptor de andrógeno (AR) faz parte da superfamília de receptores de esteróides<sup>39</sup> e sua seqüência de aminoácidos é muito semelhante à encontrada em ratos<sup>40</sup>, mas apesar da expressão do AR ter sido relatado previamente em células do músculo esquelético, não se sabe qual o tipo, ou quais os tipos de células no interior do músculo esquelético humano expressam o AR e que são o alvo da ação dos androgênios<sup>41</sup>, pois a concentração de receptores androgênicos varia de um grupo muscular para outro<sup>22</sup>. Além disso, os receptores do tecido muscular estão sujeitos à regulação pelo sistema endócrino e estes dados falam a favor de uma função fisiológica do receptor no músculo esquelético, pois os andrógenos além da sua ação androgênica em tecidos reprodutivos masculinos apresentam ação protéica anabólica no músculo esquelético<sup>42</sup>, como já relatado em estudos onde os animais mostram que a hipertrofia do músculo esquelético resultou de um aumento na expressão do AR, associado ao aumento da síntese protéica muscular<sup>43</sup>.

Segundo Sinha-Hikin (2004)<sup>41</sup>, em seu estudo observou que a expressão dos receptores androgênicos no músculo após a administração de testosterona em indivíduos do sexo masculino, saudáveis e com níveis hormonais normais, apresentou um aumento de RNAm e da expressão protéica dos receptores androgênicos nas fibras musculares e em células satélites, concluindo que as fibras musculares e as células satélites são alvos diretos da ação androgênica, estando sujeitas ao aumento da expressão de receptores, mostrando que a testosterona tem papel importante na regulação destes, modulando assim a síntese protéica e controlando a hipertrofia.

Outros estudos realizados em animais evidenciaram efeitos positivos do AAS sobre o aumento da massa e força muscular através do receptor de andrógeno<sup>23</sup> e na determinação da massa corporal magra<sup>36,37</sup>.



O decanoato de nandrolona é um derivado da testosterona e está entre os AAS mais consumidos de acordo com o *National Institute on Drug Abuse*<sup>44,45</sup> devido ao seu moderado potencial androgênico associado às boas propriedades anabólicas<sup>45,46</sup>. Tal fato se explica porque a substância ativa (nandrolona) sofre pouca influência da ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase. Nos músculos como a presença desta enzima a 5 $\alpha$ -redutase é menor, a própria nandrolona interage com os receptores para esteróides, produzindo respostas anabólicas relativamente maiores<sup>22</sup>. O complexo droga-receptor é translocado para o núcleo e liga-se à cromatina, induzindo a transcrição do RNA e a produção de proteínas específicas ocasionando seus efeitos<sup>47</sup>, como demonstrado por estudos onde houve aumento significativo no teor de proteína corporal total em animais submetidos a tratamento com doses supra fisiológicas de decanoato de nandrolona, durante 4 semanas<sup>46</sup>.

Estudos apontam que o anabolizante esteróide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) pode modular o ciclo celular, e assim alterar a massa muscular, mas os processos envolvidos ainda não estão bem esclarecidos<sup>21,38</sup>. A indução de uma lesão muscular em ratos, feita por uma droga, a bupivacaína, tem como fase inicial na recuperação do músculo neste modelo, a necrose do tecido danificado e uma resposta inflamatória, que é seguida pela ativação das células satélite e sua posterior e proliferação. A administração do anabolizante decanoato de nandrolona em ratos castrados neste estudo promoveu a melhora da recuperação das fibras musculares após sofrerem lesão induzida pela bupivacaína<sup>48</sup>.

Outro estudo realizado com dois grupos de indivíduos, homens saudáveis e homens com positividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) assintomática, utilizou o tratamento com decanoato de nandrolona e exercício de resistência e concluiu que a associação destes promoveu aumento da força muscular<sup>28</sup>.

Segundo Diel et al. (2008)<sup>38</sup>, a nandrolona quando aplicada via subcutânea em ratos estimula o aumento do peso do músculo esquelético (hipertrofia), mas tem propriedades androgênicas fracas. Essa observação pode ter relevância no que diz respeito aos aspectos terapêuticos e também na prevenção de dopagem.

Estudos mais recentes que avaliam o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) em tendões<sup>49</sup>, pacientes com caquexia devido a síndrome da imunodeficiência adquirida<sup>50</sup>, na densidade mineral óssea<sup>51</sup>, porém o efeito deste anabolizante em células precursoras miogênicas ou na linhagem de células musculares C2C12 ainda não foi descrito.

Estudos *in vitro* utilizando cultura de células têm sido bastante empregados na análise dos efeitos de drogas, recursos terapêuticos e biomateriais devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> pode ser obtido de maneira precisa, além de conseguirem-se amostras totalmente homogêneas<sup>52</sup>.

D'Ascenzo et al, (2007)<sup>53</sup> avaliaram o efeito do decanoato de nandrolona em cultura celular, porém utilizou células endoteliais humanas (HUVECs). Em seu estudo utilizou vários tipos de anabolizantes, dentre eles a nandrolona, com o objetivo de verificar o efeito dos anabolizantes sobre a proliferação, apoptose e concentração de cálcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) destas células. Os resultados mostraram que a nandrolona induziu a inibição do crescimento celular (proliferação) na concentração de 9 µM, em 24, 48 e 72 horas e 18% destas células cultivadas por 72 horas entraram em apoptose com aumento significativo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tanto na condição aguda, quanto e em culturas tratadas em longo prazo, sugerindo que andrógenos esteróides modulam níveis intracelulares de cálcio independente do tempo de incubação.

Do ponto de vista da biologia celular, se um estímulo alcança um limiar crítico à célula irá responder independentemente do fato dela estar em cultura ou *in vivo*. Logicamente, as células em cultura geralmente respondem a estímulos de muito menor intensidade, pois não existe influência de outros fatores de resposta fisiológica que auxiliam ou interferem na regulação celular, assim os dados obtidos *in vitro* não devem ser diretamente extrapolados para o uso clínico sem prévio estudo em modelo vivo e como devido ajuste das dosagens de acordo com cada situação<sup>54-56</sup>.

Este trabalho contribuiu para o conhecimento dos efeitos do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) sobre as células musculares em cultura utilizando diferentes concentrações analisando a viabilidade, proliferação, adesão e diferenciação dos mioblastos após diferentes períodos de incubação. Com este propósito, foram utilizados

mioblastos C2C12 que derivam de músculo esquelético de camundongos e exibem a maioria das características dos mioblastos normais (diferenciam-se em cultura), propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular.

Nossa suposição é que a administração do anabolizante decanoato de nandrolona aumentaria a proliferação e adesão das células musculares C2C12, estimulando assim o crescimento celular que ocorre principalmente como o objetivo de repor as células danificadas como ocorre em uma lesão muscular.

## 2. ESTUDO 1

**Artigo submetido à Revista Brasileira de Fisioterapia (ANEXO 1)**

**EFEITOS DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA SOBRE A  
PROLIFERAÇÃO E ADESÃO DE CÉLULAS MUSCULARES**

Effects of deca-durabolin<sup>®</sup> on the proliferation and adhesion of muscle cells

OLIVEIRA EN<sup>1</sup>, ARTILHEIRO PP<sup>1</sup>, SILVA, CAA<sup>2</sup>, BUSSADORI SK<sup>3</sup>, FERNANDES  
KPS<sup>3</sup>, MESQUITA-FERRARI RA<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho –  
UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Aluna do curso de fisioterapia da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São  
Paulo, SP, Brasil. Bolsista FAPESP (processo: 2009/52719-3).

<sup>3</sup> Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho  
-UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

**Título para as páginas: anabolizante e células musculares**

**Autor para correspondência:**

Profa Dra Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação

Universidade Nove de Julho - UNINOVE

Rua Vergueiro, 235, CEP 01504001

São Paulo-SP; tel (11)3385-9222

e-mail- raquel.mesquita@gmail.com

## Resumo

**Contextualização:** Estudos apontam que o anabolizante esteróide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) pode modular a regulação do ciclo celular, porém pouco é conhecido a respeito de seus efeitos sobre células musculares. Os anabolizantes são utilizados na indução do aumento da massa muscular e melhora no desempenho. **Objetivo:** Avaliar o efeito do anabolizante Deca-Durabolin® sobre a proliferação e adesão das células musculares esqueléticas precursoras C2C12. **Metodologia:** As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e em situação de carência nutricional (5% SFB) sendo posteriormente incubadas com o anabolizante nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M. Os grupos que não receberam o anabolizante nem o veículo serviram como controle. A proliferação foi avaliada após 24, 48 e 72h e a adesão após 20, 40 e 60 minutos de incubação, utilizando o método de MTT. Foram realizados três experimentos independentes, em cada condição citada, e os resultados submetidos à análise estatística com nível de significância de 0,5% ( $p \leq 0,05$  - ANOVA/Tukey). **Resultados:** Os resultados permitiram verificar que não houve diferença na proliferação e adesão entre células musculares tratadas com o anabolizante e as culturas controles em todos os parâmetros avaliados. **Conclusão:** O anabolizante decanoato de nandrolona, nas concentrações avaliadas, não foi capaz de alterar a proliferação e adesão de células musculares C2C12.

**Palavras-chave:** decanoato de nandrolona, células musculares, proliferação, adesão.

**Abstract**

**Background:** Studies indicate that the anabolic nandrolone decanoate (Deca-Durabolin®) can modulate cell cycle regulation, but little is known about its effects on muscle cells. Anabolic steroids are used to improve muscle mass and performance in the performance of exercises. **Objectives:** To evaluate the effect of anabolic Deca-Durabolin® on the proliferation and adhesion of skeletal muscle precursor cells C2C12. **Methods:** The cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and also in situations of nutritional deficiency (5% FBS) were incubated with anabolic at concentrations of 5, 10, 25 and 50 µM. The groups that received no anabolic or vehicle served as controls. The proliferation and cell adhesion were evaluated by MTT method after 24, 48 and 72h of incubation for proliferation and 20, 40 and 60 minutes to verify adhesion. Three independent experiments were performed in each condition mentioned, and the results submitted to statistical analysis with significance level of 0.5% ( $p \leq 0,05$  - ANOVA / Tukey). **Results:** Results showed no difference in proliferation and cell adhesion between muscle cells treated with anabolic and the control cultures in all parameters. **Conclusions:** The nandrolone, in the concentrations used, was not able to change and proliferation and adhesion of muscle cells C2C12.

**Keywords:** nandrolone decanoate, muscle cells, proliferation, adhesion.

## Introdução

O músculo esquelético possui grande habilidade de adaptação a situações fisiológicas incluindo treinamento, crescimento pós-natal, alongamento entre outros e frente à lesão após um trauma direto (como por exemplo, lacerações e contusões) ou devido a causas indiretas como isquemia e disfunção neurológica<sup>1-3</sup>.

Após uma lesão muscular um conjunto finamente orquestrado de respostas celulares é ativado, resultando em uma regeneração adequada deste tecido e conseqüentemente em um músculo bem innervado, vascularizado e com um aparelho contrátil íntegro<sup>1</sup>. Como as fibras musculares esqueléticas adultas são caracteristicamente bem diferenciadas, esse elevado potencial adaptativo é atribuído a uma população de células residentes no músculo esquelético adulto, denominadas de células satélites. Em situação de lesão, estas células são ativadas, passando a ser chamadas de mioblastos que proliferam-se, posteriormente se fundem para formar miotubos e por fim se diferenciam para fundirem-se a fibra pré existente ou constituir uma nova fibra muscular, de forma a repor a lesionada<sup>4-12</sup>.

As células C2C12 são um bom modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares, pois apresentam a maioria das características de células musculares normais. A linhagem C2C12, utilizada neste estudo, são um subclone da linhagem de células musculares C2, isoladas de células-satélites de ratos adultos<sup>13</sup>.

Com o intuito de melhorar a massa muscular e o desempenho, o uso dos esteróides anabólicos androgênicos (AAS) é cada vez mais freqüente em atletas das mais diversas modalidades desportivas<sup>14,15</sup>.

Como o principal andrógeno circulante é a testosterona, e já demonstrado por alguns estudos realizados em animais, os andrógenos apresentam efeitos positivos sobre o aumento da massa e força muscular através do receptor androgênico<sup>16</sup> e na determinação da massa corporal magra<sup>17</sup>.

O decanoato de nandrolona é um derivado da testosterona e está entre os AAS mais consumidos de acordo com o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA, 2000) devido ao seu moderado potencial androgênico associado às boas propriedades anabólicas. Isto pode ser explicado pois a nandrolona sofre

ação da enzima 5  $\alpha$ -redutase e produz um metabólito que tem baixa afinidade pelo receptor fazendo a própria nandrolona interagir com os receptores para esteróides, produzindo respostas anabólicas relativamente maiores<sup>18</sup>, como demonstrado por estudos onde houve aumento significativo no teor de proteína corporal total em animais submetidos a tratamento com doses supra fisiológicas de decanoato de nandrolona, durante 4 semanas<sup>19</sup>.

Alguns estudos apontam que decanoato de nandrolona pode modular a regulação do ciclo celular, e assim alterar a massa muscular, mas os processos intramusculares ainda não estão bem esclarecidos<sup>15,20</sup>. Segundo Diel et al (2008)<sup>20</sup>, a nandrolona quando aplicada via sub cutânea em ratos estimula o crescimento do músculo esquelético, mas tem propriedades androgênicas fracas. Essa observação pode ter relevância no que diz respeito aos aspectos terapêuticos, mas também na prevenção de dopagem.

Um estudo realizado com dois grupos de indivíduos (homens saudáveis e homens com positividade para o vírus da imunodeficiência humana assintomática) utilizou como tratamentos o anabolizante e exercício de resistência e evidenciou que o anabolizante apresentou melhor resultado quando associado ao exercício. Portanto a terapia do andrógeno isoladamente não melhorou a qualidade muscular (capacidade de geração de força de contração muscular contra resistência)<sup>21</sup>. No entanto, outro estudo realizado em ratos demonstrou que a remodelação do tendão muscular pode ser prejudicada na presença da combinação de dois tipos de anabolizantes andrógenos (Deca-Durabolin® e Durateston®), com ou sem carga de exercício, apresentando como resultado a diminuição da atividade MMP-2 enzima que atua na modificação ou na degradação dos componentes da matriz extracelular em condições normais e de remodelamento dos tecidos<sup>22</sup>.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações sobre a viabilidade, proliferação e adesão dos mioblastos após diferentes períodos de incubação. Foram utilizados mioblastos C2C12 que derivam de músculo esquelético de camundongos e exibem a maioria das características dos mioblastos normais (diferenciam-se em cultura), propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular.



## **Metodologia**

### **Cultura celular**

A linhagem celular C2C12 utilizada no presente trabalho é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos<sup>23,24</sup>. Estas células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 5 e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico solução antimicótica (CULTILAB) e mantidas em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento celular foi feita a cada 24 horas e quando a monocamada celular se tornava subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular, foi realizado o subcultivo com lavagem tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM; pH 7,4) e solução de tripsina. As células foram centrifugadas a 1200rpm e posteriormente ressuspensas em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos experimentos as células com viabilidade maior que 95%.

### **Ensaio de viabilidade (proliferação) celular (MTT)**

A viabilidade (proliferação) celular foi avaliada após 24, 48 e 72h da incubação com o decanoato de nandrolona Deca-Durabolin® (Organon, Brasil) nas concentrações finais de 5µM, 10µM, 25 µM e 50µM<sup>14</sup> (Organon, Brasil) ou do veículo da droga (1,5:1 - álcool benzílico/óleo de amendoim)<sup>22</sup>, adicionado em diferentes quantidades de acordo com as concentrações utilizadas do anabolizante (veículo 5, 10, 25 e 50 µM respectivamente).

A metodologia utilizada para avaliação da viabilidade e proliferação celular se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue), formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis<sup>25</sup>. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados.

Foram utilizadas para este ensaio  $1 \times 10^3$  células/poço adicionadas a placas de cultura de fundo chato de 96 poços, estéreis (Costar) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e  $5\%\text{CO}_2$  durante os diferentes períodos de incubação avaliados, ou seja, 24, 48 e 72 horas. As células foram mantidas em DMEM e duas condições diferentes de cultivo foram avaliadas, sendo a primeira a situação regular quanto ao suprimento nutricional, ou seja, 10% SFB e a segunda em situação de carência nutricional (5% SFB) para simulação de lesão<sup>26</sup>.

Ao término do período de incubação, foi feita a lavagem dos poços com PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4mM; pH 7,4) para remoção das células mortas e adicionado o MTT (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e realizada a incubação das células por 4h a  $37^\circ\text{C}$  e  $5\%\text{CO}_2$ . Em seguida, foi adicionado isopropanol para solubilizar os cristais formados. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 620nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Áustria)<sup>27,28</sup>. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, de forma independente, e cada amostra foi analisada em quadruplicata.

### **Ensaio de adesão celular**

Para a realização dos ensaios de adesão celular, as células musculares foram cultivadas em DMEM contendo 10% SFB, foi adicionado o anabolizante Deca-Durabolin® (decanoato de nandrolona) nas concentrações finais de  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$  e  $50\mu\text{M}$  ou somente o veículo da droga (nas proporções utilizadas para as diferentes concentrações utilizadas do anabolizante) a  $0,5 \times 10^5$  células/poço, em placas estéreis de 96 poços. A análise foi realizada utilizando o protocolo descrito anteriormente para o ensaio de proliferação (MTT), após 20, 40 e 60min de incubação com a droga ou somente com o veículo da droga. Células cultivadas na ausência do anabolizante ou veículo serviram como controle.

### **Análise estatística**

As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância ANOVA sendo o teste de Tukey utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais. Valores de  $p \leq 0,05$  foram

considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **Resultados**

### **Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) sobre a viabilidade, proliferação e adesão de células musculares**

Os resultados permitiram verificar que não houve diferença significativa na viabilidade e proliferação celular, avaliada pelo método MTT, entre as células musculares tratadas com o anabolizante e as células controle tanto na situação de carência nutricional (5% de SFB) (figura 1) quanto na condição de cultivo em meio regular (10% de SFB) (figura 2). O mesmo pode ser observado para a adesão celular uma vez que esta não sofreu alteração na presença do anabolizante utilizado, após os diferentes períodos de incubação avaliados (figura 3). Além disso, foi possível verificar que houve um aumento do número de células com o aumento do período de incubação, tanto no grupo controle quanto nos tratados, conforme esperado (figuras 1, 2 e 3).

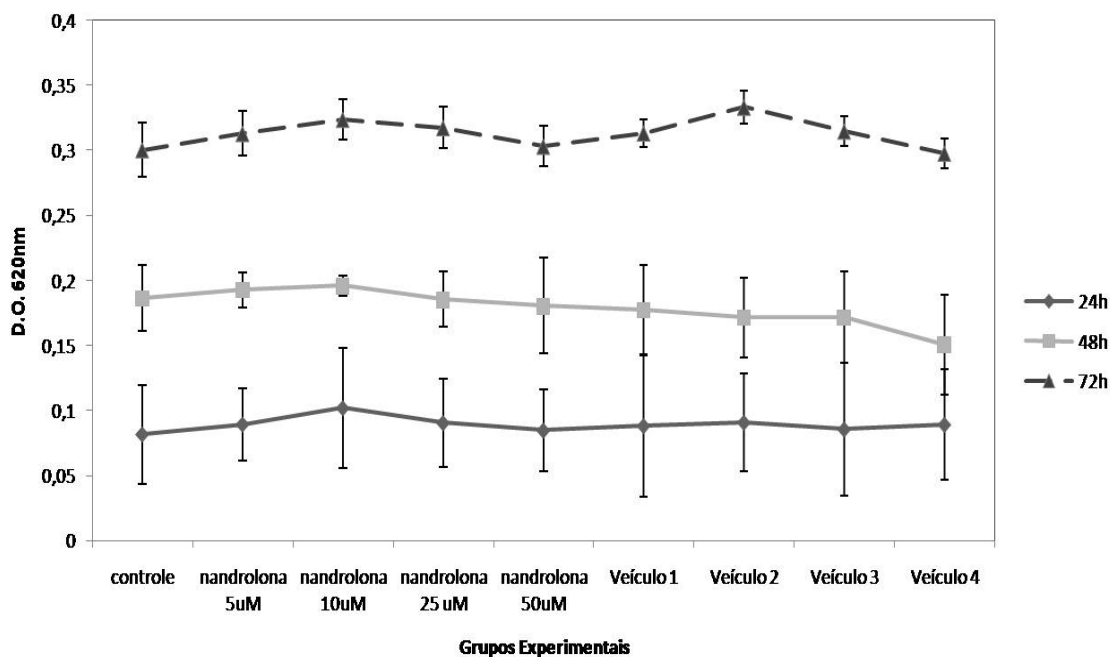


Figura 1. Avaliação da proliferação e viabilidade celular mensurada como absorbância (DO<sub>620nm</sub>) pelo MTT das culturas de células musculares cultivadas em situação de carência nutricional (simulação de lesão - 5% de SFB) por 24, 48 e 72h, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ou somente com o veículo da droga adicionado em diferentes quantidades de acordo com as respectivas concentrações avaliadas do anabolizante.

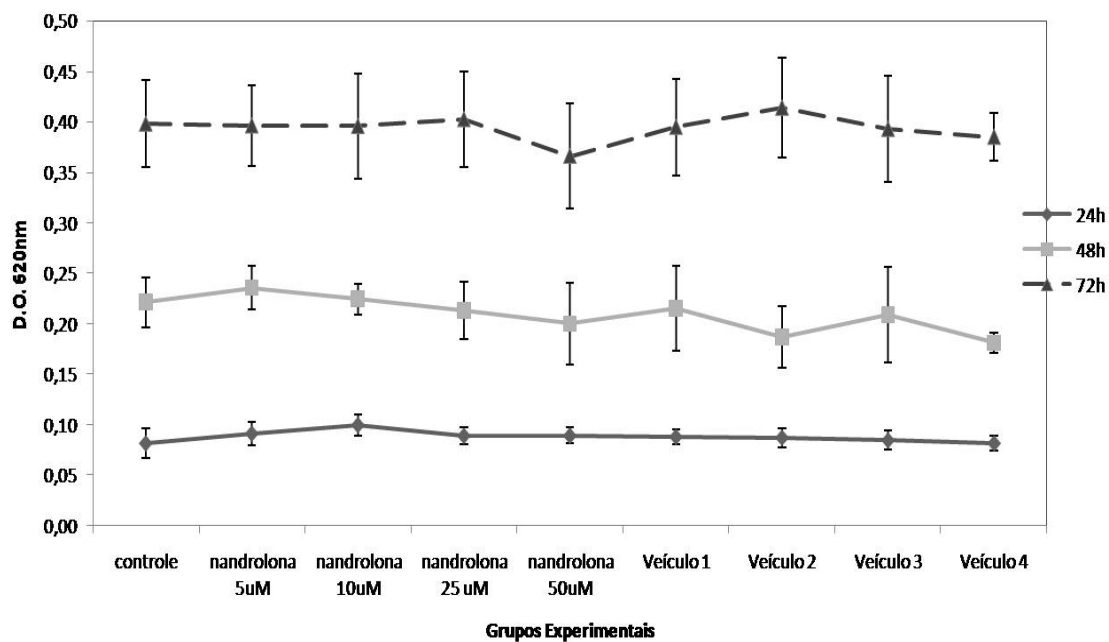


Figura 2. Avaliação da proliferação e viabilidade celular mensurada como absorbância (DO620nm) pelo MTT das culturas de células musculares cultivadas em situação em meio regular (10% de SFB) por 24, 48 e 72h, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações ou somente com o veículo da droga.

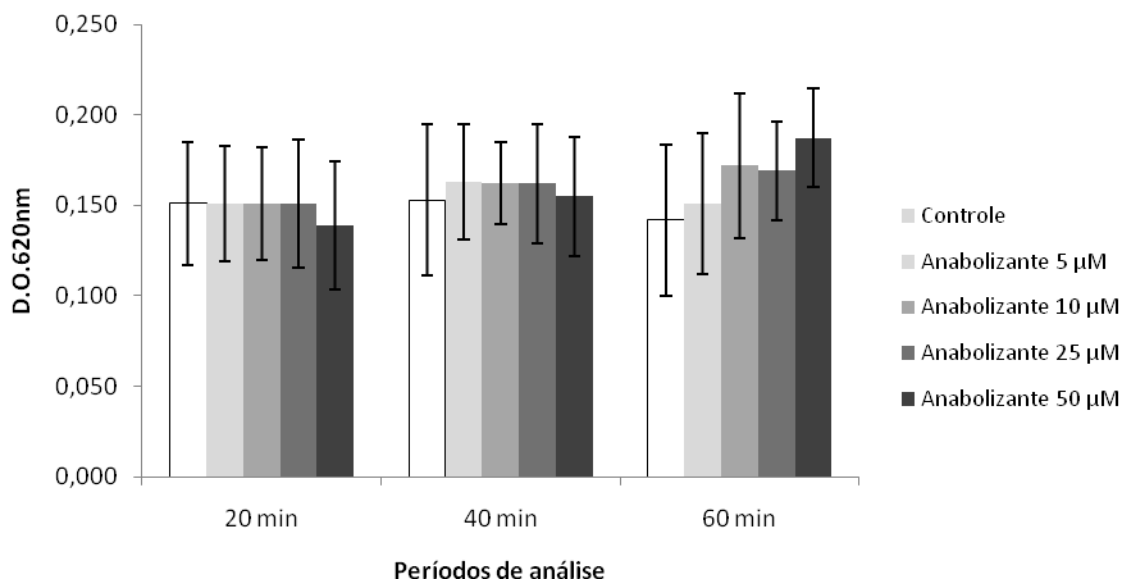


Figura 3. Avaliação da adesão das células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações.

## Discussão

A cultura celular é definida como um artefato, permitindo que o pesquisador tenha um controle rigoroso sobre diversas variáveis do processo e possa fazer questionamentos de maneira mais sistemática. Portanto, estudos *in vitro* avaliando o potencial do anabolizante decanoato de nandrolona são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse anabolizante esteróide de forma mais eficaz e segura<sup>29</sup>.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) sobre a proliferação e adesão de células musculares em situação de carência nutricional (simulação de lesão - 5% de SFB) e em situação em meio regular (10% de SFB). No entanto, os resultados evidenciaram que a utilização do anabolizante decanoato de nandrolona nessas células não proporcionou alteração sobre a proliferação e adesão celular em todas as concentrações avaliadas. É importante ressaltar que, apesar de o anabolizante decanoato de nandrolona não ter induzido

aumento de proliferação, não causou sua inibição, sendo observado o aumento do número de células após 48h quando comparado a 24h e 72h, quando comparado ao período de 48h de incubação, não apresentando desta forma, efeito citotóxico, nestas concentrações. Da mesma forma frente à adesão celular, não houve alteração da proliferação e adesão celular na presença do anabolizante, nos diferentes períodos avaliados.

A linhagem celular C2C12 utilizada representa um bom modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares. O uso de linhagens celulares para a análise da proliferação celular elimina a possibilidade de o anabólico esteróide decanoato de nandrolona interferir na produção de fatores de crescimento de células não-miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos<sup>26,30,31</sup>.

O modelo de lesão muscular utilizado, ou seja, cultivo em situação de carência nutricional, foi baseado no fato de que, imediatamente após a lesão muscular a área traumatizada sofre lesão isquêmica, ocasionando falta de nutrientes e oxigênio, e que as células cultivadas no soro de baixa e média concentrações passem pelo mesmo processo<sup>32</sup>. Assim, as condições de estresse *in vitro* podem ser realizadas por diferentes linhagens de células variando a concentração de SFB no meio de cultura. Utilizando um meio de cultura suplementado com SFB 5%, a viabilidade das células C2C12 é mantida, mas as taxas de crescimento são significativamente inferiores às das células cultivadas<sup>26</sup>. Shefer (2003)<sup>32</sup> e Ferreira (2009)<sup>26</sup>, verificaram em seus estudos que a utilização de meio de cultura com 5% de soro fetal bovino mantinham a viabilidade das células C2C12, mas que as taxas de crescimento eram significativamente inferiores as das células cultivadas em meio com 10% de soro fetal bovino.

Este fato pôde ser observado nos resultados apresentados uma vez que a taxa de crescimento foi inferior nas células cultivadas em deficiência nutricional (5% de SFB) em comparação as células mantidas com suplemento nutricional regular (10% de SFB).

Nossos estudos demonstraram que as concentrações do anabolizante decanoato de nandrolona nas culturas celulares propostas em neste estudo, ou seja deficiência nutricional (5% de SFB simulação de uma lesão muscular) e as células mantidas com suplemento nutricional regular (10% de SFB) não

apresentaram alterações no crescimento celular. Provavelmente estas células para apresentarem uma resposta de crescimento neste período proposto (24, 48 e 72 horas) necessitariam de uma concentração de anabolizante maior. Se aumentássemos o período de incubação para mais horas fugiríamos do protocolo de curto prazo que são estabelecidos até 72 horas.

O mesmo pode ter ocorrido com relação a adesão celular. Nossos dados mostraram que não houve aumento da adesão das células tratadas com o anabolizante em comparação ao grupo controle e aos demais.

A dificuldade de comparação dos nossos resultados com outros descritos na literatura são grandes, uma vez que não encontramos a utilização do anabolizante decanoato de nandrolona em culturas celulares utilizando como modelo a linhagem C2C12 juntamente com as condições de nutrição celular proposta neste estudo.

Já em estudos *in vivo* encontramos relatos que referem os efeitos benéficos em termos de massa muscular e capacidade contrátil após uso de anabolizantes. Lewis et al, (1999)<sup>33</sup> evidenciam uma melhora significativa da função contrátil do diafragma, avaliada isométrica e isotonicamente, após administração prolongada de nandrolona em ratos machos, observando uma hipertrofia de todos os tipos de fibra, com um ligeiro aumento na proporção de fibras do tipo II em animais submetidos à nandrolona, a contribuição relativa dos tipos de fibra da área total do diafragma permaneceu semelhante entre animais submetidos à nandrolona e animais controle. Outro estudo realizado com pacientes submetidos à hemodiálise 3 vezes por semana demonstrou que associação de nandrolona com exercícios de resistência para membros inferiores por 12 semanas, aumentou a área transversal do músculo quadríceps, concluindo que tanto o decanoato de nandrolona quanto o exercício resistido parecem ser opções seguras para o tratamento da perda de massa muscular e fraqueza destes pacientes<sup>34</sup>.

Em adição, outros estudos *in vivo* demonstram que os efeitos do decanoato de nandrolona foram dependentes da musculatura avaliada, tempo de tratamento, dose e associação ou não com exercícios, sendo todos capazes de promover o aumento da massa muscular<sup>20, 33-35</sup>, alteração do ciclo celular<sup>15</sup>, densidade mineral óssea<sup>36</sup>, crescimento ósseo<sup>37</sup> e segundo estudos o receptor de andrógeno tem grande influência nestes efeitos<sup>20,38,39</sup>. Este fato nos auxilia



no questionamento da possibilidade do decanoato de nandrolona interferir no processo de reparo muscular e como outros tipos celulares estão envolvidos diretamente ou não diretamente sobre a proliferação das células musculares.

Com relação ao remodelamento de tendões Marqueti et al, (2006)<sup>22</sup> evidenciaram que o tratamento utilizando o decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) prejudicou este processo em tendões de animais submetidos ao exercício físico, aumentando assim o potencial de lesão tendínea.

D'Ascenzo et al, (2007)<sup>14</sup> avaliaram o efeito do decanoato de nandrolona em cultura celular, porém utilizou células endoteliais humanas (HUVECs), dificultando a comparação com os presentes achados. Em seu estudo utilizou vários tipos de anabolizantes, dentre eles a nandrolona, para verificar o efeito destes sobre a proliferação, apoptose e concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Estes autores verificaram que a nandrolona induziu a inibição do crescimento celular na concentração de 9  $\mu$ M, em 24, 48 e 72 horas e 18% destas células cultivadas por 72 horas entraram em apoptose com aumento significativo de  $[Ca^{2+}]_i$  tanto na condição aguda, quanto e em culturas tratadas a longo prazo, sugerindo que andrógenos esteróides modulam níveis intracelulares de cálcio independente do tempo de incubação.

Em conclusão, o anabolizante esteróide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) nas concentrações utilizadas não foi capaz de alterar a viabilidade e proliferação celular, avaliada pelo método MTT, tanto na situação de carência nutricional (5% de SFB), quanto na condição de cultivo em meio regular (10% de SFB). Novos estudos são necessários para o melhor entendimento de outros possíveis efeitos do anabolizante esteróide decanoato de nandrolona sobre essas células como, por exemplo, no processo de diferenciação celular. Estes conhecimentos poderão auxiliar o estabelecimento de protocolos clínicos adequados a serem utilizados para um melhor reparo e recuperação clínica de paciente que sofreu algum tipo de lesão muscular.

## Referências Bibliográficas do Estudo 1

1. Charge, Sophie B. P., and Michael A. Rudnicki. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol* 2004; 84: 209–238.
2. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 1994; 22(5): 702-710.
3. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20: 1692–708.
4. Zammit, PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *Journal of Cell Science* 2008; 121: 2975-2982.
5. Foschini, RMSA, Ramalho, FS, Bicas, HEA. Células satélites musculares. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2004; 67(4): 681-867.
6. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of Cell Biology* 2003;162 (6) 1135-1147.
7. Cabane C, W Englaro, K Yeow, M Ragno, B Derijard. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 284: C658-C66.
8. Grounds, MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002;(50) 589-610.
9. Kook, S.H., Lee, H. J., Chung, W.T., Hwang, I.H., Lee, S.A., Kim, B.S., Lee, J.C. Cyclic Mechanical Stretch Stimulates the Proliferation of C2C12 Myoblasts and Inhibits Their Differentiation via Prolonged Activation of p38 MAPK. *Mol. Cells*, 2008; 25(4): 479-486.
10. Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated Plasma Protein-A Regulates Myoblast Proliferation and Differentiation through an Insulin-like Growth Factor-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 2005; 280(45): 37782–9.
11. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282(20): 15000-10.
12. Stuelsatz, P, Pouzoulet F, Lamarre Y, Dargelos E, Poussard S, Leibovitch S, Cottin P, Veschambre P. Down-regulation of myod by calpain 3 promotes generation of reserve cells in c2c12 myoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285,12670-12683.
13. Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270:725-7.
14. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Sacconi-Jotti G, Botre F, Carta G, Tozzi-Ciancarelli, MG, Pavan A, Dolo V. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett.* 2007 8;169(2):129-36.
15. McClung JM, Mehl KA, Thompson RW, Lowe LL, Carson JA. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R1543-R1552.

16. Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *Journal of Endocrinology* 2005; 186, 21-31.
17. Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, Lanz RB, Zoumpourlis VC, Schwartz RJ. Recruitment of the Androgen Receptor via Serum Response Factor Facilitates Expression of a Myogenic Gene. *The journal of biological chemistry* 2005; 280 (9) 7786–7792.
18. Silva, P. R. P.; Danielski, R.; Czepielewski, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2002; 8 (6) 235-243.
19. Fermo RS, Rego J NI, Franquini JVM, Andrade TU. Effect of food supplementation over anabolic action of nandrolone decanoate on rats. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2008; 5(1), 111-121.
20. Diel P, Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenschlager U, Schänzer W, Schleipen B, Thevis M, Vollmer G, Zierau O. The prohormone 19-norandrostenedione displays selective androgen receptor modulator (SARM) like properties after subcutaneous administration. *Toxicology Letters* 2008; 177:198–204.
21. Schroeder, E. Todd, Michael Terk, and Fred R. Sattler. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003; 285: E16–E24.
22. Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguer RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. 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* 2006; 34(8) 1274-1280.
23. Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist on fibroblast. *Int J Dermatol*. 2007; 46(6):587-93.
24. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol*. 2005; 31(12):1701-6.
25. Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron*. 2000; 31(1):41-53.
26. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Martins MD, Bussadori SK, Gonzales DAB, Fernandes KPS et al. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(6):901-6.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(2):55-63.
28. Woerdenbag HJ, Merfort I, Passreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, van Uden W, et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med* 1994; 60(5):434-7.
29. Johns LD. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J Athl Train*. 2002; 37(3):293-9.
30. Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci*. 2005; 97:369-76.

31. Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, Agarwal S. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:C267-76.
32. Shefer, G., Barash, I., Oron, U., and Halevy, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim. - Biophys. Acta.* 2003; 1593, 131–139.
33. Lewis, Michael I., Mario Fournier, Amelia Y. Yeh, Paul E. Micevych, and Gary C. Sieck. Alterations in diaphragm contractility after nandrolone administration: an analysis of potential mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 1999 86(3):985–992.
34. Johansen KL, Painter PL, Sakkas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T. Effects of resistance exercise training and nandrolone decanoate on body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: a randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2307–2314.
35. Lee DK. Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 294: 408–413.
36. Frisoli, Jr A, Chaves PHM, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. The Effect of Nandrolone Decanoate on Bone Mineral Density, Muscle Mass, and Hemoglobin Levels in Elderly Women With Osteoporosis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of Gerontology.* 2005;60A(5), 648–653.
37. Gebhardt A, Pancherz H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2003.
38. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, et al. *PNAS.* 2003; 100 (16) 9416–9421.
39. Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285:E197–E205.

## 2. ESTUDO 2

Artigo submetido à Revista Brasileira de Fisioterapia (ANEXO 2)

### EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MUSCULARES EM LONGO PRAZO

OLIVEIRA EN<sup>1</sup>, FERNANDES KPS<sup>3</sup>, BARBOSA, JLP<sup>2</sup>, SILVA JR JA<sup>3</sup>,  
BUSSADORI SK<sup>3</sup>, MESQUITA-FERRARI RA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Aluno do curso de biomedicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho -UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

#### **Autor correspondente:**

Profa Dra Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação

Universidade Nove de Julho - UNINOVE

Rua Vergueiro, 235, CEP 01504001

São Paulo-SP

tel (11)3385-9222

e-mail- raquel.mesquita@gmail.com

**Resumo**

Os anabolizantes androgênicos esteróides (AAS) são utilizados com o objetivo de melhorar a massa muscular e o desempenho na prática desportiva.

**Objetivo:** Avaliar o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a expressão dos marcadores miogênicos MyoD e miogenina e sobre a proliferação a longo prazo das células musculares esqueléticas C2C12.

**Metodologia:** As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e em situação de carência nutricional (5% SFB) e incubadas com o decanoato de nandrolona nas concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M ou com o veículo para avaliação da proliferação celular em longo prazo 3 e 5 dias. O grupo controle foi representado por culturas celulares que não receberam o anabolizante/veículo. A avaliação da proliferação foi realizada pelo método MTT. A expressão dos marcadores miogênicos foi avaliada em células cultivadas com 10% de soro fetal bovino após 2, 4 e 8h do tratamento com o anabolizante/veículo na dosagem de 5  $\mu$ M utilizando o PCR em tempo real e primers específicos para os marcadores miogênicos miogenina e MyoD. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados submetidos à análise estatística ( $p \leq 0,05$  - ANOVA/Tukey). **Resultados:** Os resultados evidenciaram um aumento estatisticamente significativo na proliferação das células musculares tratadas com anabolizante na concentração de 5 $\mu$ M e 25 $\mu$ M com relação as demais concentrações e ao controle, na situação de meio regular e simulação de lesão respectivamente. Com relação a expressão gênica foi verificado que após 8 horas da incubação os mioblastos C2C12 apresentaram um aumento na expressão da miogenina em comparação aos demais períodos embora não tenham sido verificadas alterações significativas entre o grupo controle e os grupos tratado com anabolizante ou veículo enquanto que a expressão de MyoD não sofreu alteração nos períodos e grupos avaliados. **Conclusão:** O anabolizante induziu aumento de proliferação das células musculares após cinco dias de forma dose dependente, tanto em situação regular como na simulação de lesão e, além disso, houve aumento na expressão de miogenina após 8h em todos os grupos avaliados.

**Palavras-chave:** decanoato de nandrolona, mioblastos, proliferação, diferenciação.

**Abstract**

The androgenic anabolic steroids (AAS) are used with the aim of improving muscle mass and performance in sports. **Objective:** To evaluate the effect of anabolic steroid nandrolone decanoate on the expression of myogenic markers MyoD and myogenin and the long-term proliferation of C2C12 skeletal muscle cells. **Methods:** Cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and in situations of nutritional deficiency (5% FBS) and incubated with the steroid at concentrations of 5, 10, 25 and 50 $\mu$ M and quantity of its vehicle for evaluation of cell proliferation in long term 3 to 5 days. The control group was represented by cell cultures that had not received anabolic / vehicle. The evaluation of long-term proliferation was measured by mitochondrial activity (MTT assay). The expression of myogenic markers was assessed in cells grown with 10% fetal calf serum at 2, 4 and 8 hours of treatment with steroid or vehicle at a dosage of 5  $\mu$ M using real time PCR and primers specific for the myogenic markers myogenin and MyoD. Three independent experiments were performed and the results submitted to statistical analysis ( $p \leq 0.05$  - ANOVA / Tukey). **Results:** The results showed a statistically significant increase in proliferation of muscle cells treated with steroid at a concentration of about 5 $\mu$ M e 25 $\mu$ M and the other concentrations and control of the situation through regular and simulation of injury respectively. In gene expression found that after 8 hours of incubation, C2C12 myoblasts showed an increased expression of myogenin in comparison to other periods veirifcadas although no significant changes between the control group and groups treated with steroid or vehicle while MyoD did not change during the periods and groups. **Conclusion:** The anabolic induced increase in muscle cell proliferation after five days in a dose-dependent manner, in both regular and nutritional deficient conditions, there was an increased in myogenin expression after 8 h in all experimental groups.

Keywords: nandrolone decanoate, myoblasts, proliferation, differentiation.

## Introdução

Os anabolizantes androgênicos esteróides (AAS) são utilizados com o objetivo de melhorar a massa muscular e o desempenho na prática desportiva. A lesão muscular é algo freqüente em atletas e a busca por um processo de reparo rápido e eficiente tem se tornado cada vez mais evidente na prática clínica vem aumentando a necessidade de estudos na área<sup>1</sup>.

O músculo esquelético do adulto é altamente adaptável ao estresse e esta característica se deve em parte à sua notável capacidade regenerativa e capacidade de manutenção do trabalho da musculatura esquelética<sup>2,3</sup>. Sua estrutura consiste de fibras musculares e células satélites embebidas em uma matriz extracelular (MEC)<sup>4</sup>. Estas células encontram-se em estado quiescente e estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares<sup>2,5</sup>.

A capacidade de adaptação frente a estímulos como envelhecimento, exercício, alteração hormonal, estimulação elétrica, alteração funcional, entre outros se deve em grande parte a presença destas células precursoras<sup>4,5,6</sup>. Além disso, representam são a principal fonte de crescimento e regeneração muscular responsável pelo crescimento muscular pós-natal<sup>6,7</sup>.

Depois de ativadas, essas células, passam a se chamar mioblastos<sup>8</sup> que proliferam e em seguida, se diferenciam e se fundem em miotubos multinucleados. Este processo é chamado de miogênese e é essencial para o desenvolvimento muscular pós-natal e manutenção, bem como para a reparação das fibras do músculo lesionado<sup>9</sup>. Em contraste, as células satélites ativadas podem sair do ciclo celular, restabelecer um estado de descanso, e podem se estimuladas novamente para reiniciar o ciclo celular, sugerindo que as células são capazes de auto-renovação ou reposição de um “pool” residual de células<sup>10,11,12</sup>.

Durante as etapas da miogênese as células expressam fatores miogênicos regulatórios entre eles o MyoD que marca a ativação das células satélites (proliferação) e a miogenina que marca o início da diferenciação<sup>13</sup>. Estas etapas podem ser divididas em duas fases: determinação e diferenciação. A determinação é o evento em que as células satélites pluripotentes, que estão se multiplicando, são mobilizadas para o processo



miogênico, transformando-se em mioblastos. A diferenciação ocorre quando os genes dos miotúbulos iniciam sua expressão músculo-específica, e então os mioblastos param de se multiplicar, e as fibras musculares passam a crescer quase que somente em volume<sup>14,15</sup>. Os mioblastos que expressam Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, genes que regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares multinucleadas, tornando o músculo esquelético um tecido estável<sup>16</sup>.

A resposta de crescimento celular com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético parece exigir a integração de vários estímulos de sinalização incluindo o fator hormonal<sup>17</sup>. A indicação terapêutica para o uso de hormônios esteróides androgênicos (“anabolic-androgen steroids” – AAS) está associada vários quadros, inclusive de perda muscular<sup>18-29</sup>.

Como o processo de reparo muscular é muito lento e, dependendo da gravidade da lesão, muitas vezes ocorre uma recuperação parcial, encontrar a melhor forma de tratamento para todas as fases da reparação muscular é uma questão desafiadora em reabilitação<sup>30,31</sup>.

Alguns estudos relatam que o anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>), um derivado da testosterona com propriedades anabólicas boas, pode modular o ciclo celular e assim alterar a massa muscular, mas os processos envolvidos ainda não estão bem esclarecidos<sup>5,17,32</sup>.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) na expressão de marcadores miogênicos e proliferação das células musculares em longo prazo.

## **Material e Métodos**

### **Cultivo celular**

A linhagem das células C2C12 é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de ratos adultos<sup>33,34</sup> e foram doadas pelo Dr. José Ernesto Belizario da Universidade de São Paulo, Brasil. As células C2C12 foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, CULTILAB, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, CULTILAB), e 1% antibiótico solução antimicótica

(CULTILAB), a 37°C, em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em densidades de subconfluência e subcultivadas a cada 2-3 dias. Antes dos experimentos, todas as culturas de células foram examinadas com um microscópio de luz (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) e a viabilidade das culturas foi confirmada pelo teste de exclusão Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

As células foram cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% antibiótico solução antimicótica (CULTILAB) e mantidas em estufa 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para simulação de lesão (estresse celular), as células também foram cultivadas em situação de carência nutricional (5% de SFB)<sup>35</sup> e, portanto permitindo a observação dos possíveis efeitos das diferentes concentrações do anabolizante na proliferação.

## **Avaliação da expressão dos marcadores miogênicos**

### **Extração de RNA total**

Para a realização da extração de RNA total, os mioblastos C2C12 foram cultivados em DMEM contendo 10% SFB e para esta etapa foram utilizadas 1,5X10<sup>6</sup> células cultivadas em placas de petri de 4 cm de diâmetro, estéreis (marca TPP), com meio de cultura DMEM, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foram analisadas três condições: (a) Mioblastos controle (sem tratamento); (b) Mioblastos tratados com decanoato de nandrolona (5µM); (c) Mioblastos tratados com veículo (quantidade respectiva). Os grupos tratados foram avaliados 2, 4 e 8h após a incubação do anabolizante ou veículo. A escolha da concentração foi baseada em experimentos anteriores que não evidenciaram diferenças na proliferação celular em curto prazo nas diferentes concentrações e, desta forma, foi usada a menor concentração para otimizar a utilização do anabolizante uma vez que esta técnica permite avaliar de forma sensível as alterações na expressão gênica.

Após o período de incubação as células foram homogenizadas em 1ml do reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para iniciar o isolamento

do RNA total, seguindo as orientações do fabricante. Na seqüência, foi realizada a centrifugação das amostras e feita a transferência do sobrenadante para um novo microtubo. Foram adicionados 200µl de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e a transferência da fase aquosa superior contendo o RNA total para um novo microtubo. Por fim, foram adicionados 500µl de isopropanol para precipitação do RNA total. A ressuspensão do RNA total precipitado foi feita utilizando água livre de RNase e as amostras foram armazenadas a - 80 °C.

O RNA total foi quantificado por espectrometria em 260nm e todas as amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC (Dimetil pirocarbonato) e, além disso, os materiais plásticos e vidraria também receberam tratamento contra RNase.

### **Síntese de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo**

Para análise da expressão gênica foi utilizada a síntese de cDNA e o PCR em tempo real. A transcrição reversa (RT) foi realizada em uma reação de 200 µl, na presença de 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10 ditiotretitol mM, 0,5 mM dNTPs e 50ng de primers aleatórios com 200 unidades de Moloney murino transcriptase reversa do vírus da leucemia (Invitrogen). As reações foram mantidas em condições de 20 ° C por 10 min, 42 ° C por 45 min e 95 ° C por 5 minutos. Um microlitro da reação do RT foi utilizada para realização do PCR em tempo real.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o kit SYBRGreen (Applied Biosystems, E.U.A.) em 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, da Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições utilizadas foram 50°C por 2min, 95°C por 10 min., seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada ponto de dados. A abundância de MyoD e miogenina RNAm foi quantificada como um valor relativo em comparação com a expressão de gene constitutivo (GAPDH).

Os primers utilizados para a reação de PCR em tempo real foram: GAPDH (GenBank™ número de acesso NM 017008) senso 5'-

TGCACCACCAACTGCTTAGC -3' e anti-senso GCCCCACGGCCATCA -3'<sup>36</sup>;  
 MyoD senso 5' GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC e anti-senso AGC ACC  
 TGG TAA ATC GGA TTG (produto de amplificação: 80pb)<sup>37</sup>; Miogenina  
 senso 5'ACTACCCACCGTCCATTAC- 3' e anti-senso  
 3'TCGGGGCACTCACTGTCTCT 5' (produto 233)<sup>39</sup>.

Os valores quantitativos para RNAm de MyoD, miogenina e GAPDH foram obtidos a partir do número de ciclos (CT – threshold cycle), em que há aumento do sinal associado a um crescimento exponencial dos produtos de PCR.

As curvas de fusão foram geradas no final de cada corrida para garantir a uniformidade do produto. O nível de expressão relativa do gene alvo foi normalizado com base na expressão GAPDH como controle endógeno.  $\Delta$ Ct valores das amostras foram determinados subtraindo o valor médio de Ct MyoD/miogenina RNAm Ct do valor médio da GAPDH de controle interno. Como é raro usar  $\Delta$ Ct como dados relativos devido a esta característica logarítmica, o parâmetro  $2^{-\Delta$ Ct foi utilizada para expressar os dados de expressão relativa.

### **Avaliação da proliferação celular em longo prazo**

Para realização do protocolo de proliferação em longo prazo, foi adicionado o anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) (Organon, Brasil) nas dosagens 5, 10, 25 e 50 $\mu$ M e quantidade respectiva do veículo (constituição 1 ½ de álcool benzílico para 1 de óleo de amendoim)<sup>40</sup> nos mioblastos C2C12 e posteriormente realizamos a análise em diferentes períodos de incubação (3 e 5 dias). As células do grupo controle não receberam o anabolizante e nem o veículo. Foram utilizadas  $2 \times 10^2$  de células em placas de 96 poços de fundo chato nas situações de cultivo de carência nutricional (5% de SFB) e regular (10% de SFB).

A escolha das concentrações utilizadas baseou-se no estudo realizado por D'Ascenzo et al (2007)<sup>1</sup>. Após o término do período de incubação foi realizada a análise da atividade mitocondrial para avaliar a viabilidade e proliferação celular. A função mitocondrial dos mioblastos C2C12 foi avaliada por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Depois da incubação com o

anabolizante/veículo por 3 e 5 dias, o MMT foi adicionado às culturas celulares numa concentração de 0,5 mg/mL e as células foram incubadas num ambiente úmido, contendo 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C por 3h. Após este período, 100 µl de isopropanol foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazana. A absorbância foi medida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria).

As amostras foram feitas em quadruplicatas e apresentados como médias e desvio padrão.

### **Análise estatística**

As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância, ANOVA, sendo o teste de Tukey utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata e realizados três experimentos independentes, embora apenas um experimento único representativo de três está exposto em cada figura.

## **Resultados**

### **Expressão de marcadores miogênicos**

Com relação a expressão de MyoD pelas células musculares foi possível verificar que não houve alteração significativa em todos os períodos e grupos experimentais avaliados (figura 1).

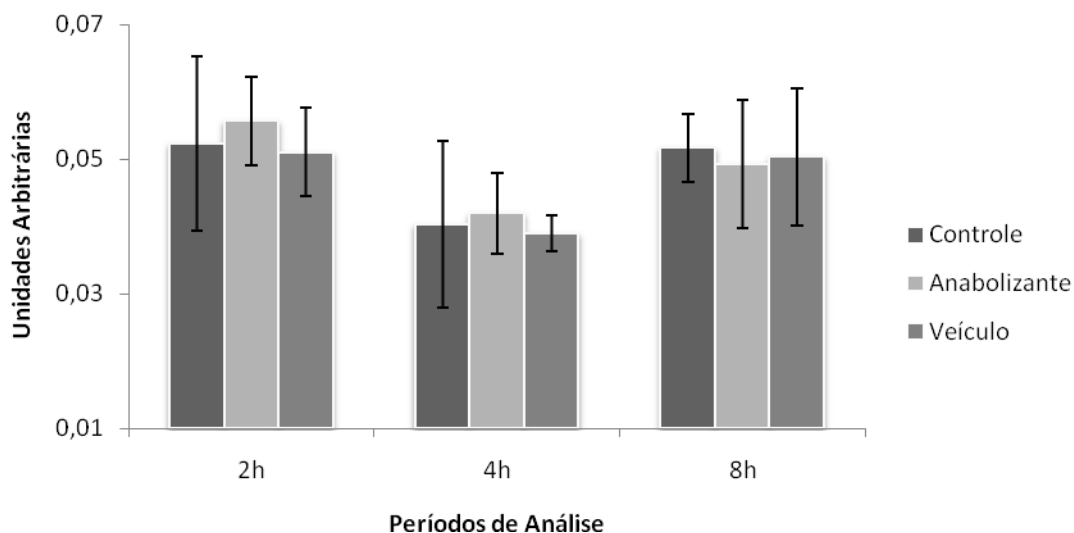


Figura 1. Análise da expressão gênica MyoD nas células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona na concentração de 5  $\mu$ M, após 2, 4 e 8h de incubação.

Contudo, os resultados de expressão de miogenina demonstraram que houve um aumento significativo após 8h em todos os grupos experimentais com relação aos períodos de 2 e 4 horas porém também não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos controle, tratado com o anabolizante ou com o veículo (figura 2).

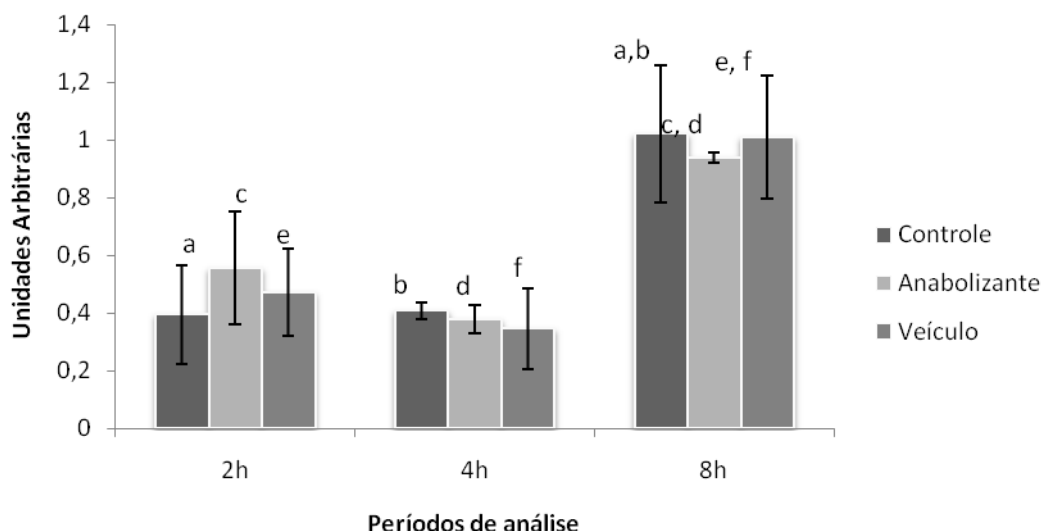


Figura 2. Análise da expressão gênica miogenina nas células musculares na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona na concentração de 5  $\mu$ M, após 2, 4 e 8h de incubação. A mesma letra denota diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ /ANOVA/Tukey)

### Avaliação da proliferação em longo prazo de células musculares

Em relação a viabilidade e proliferação celular a longo prazo, analisada pelo MTT nas células tratadas com anabolizante/veículo nas concentrações de 5, 10, 25 e 50  $\mu$ M, tanto na situação de carência nutricional (5% de SFB)(figura 3) quanto na condição de cultivo em meio regular (10% de SFB)(figura 4). Verificamos aumento significativo da proliferação celular em 5 dias de incubação do anabolizante decanoato de nandrolona nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ M nas células mantidas em 5% de soro fetal bovino.

Em relação às células mantidas em em 10% de soro fetal bovino verificamos em 5 dias também um aumento da proliferação celular na concentração de 5  $\mu$ M, mas neste mesmo período (5 dias) observamos uma redução estatisticamente significativa na concentração de 50  $\mu$ M.

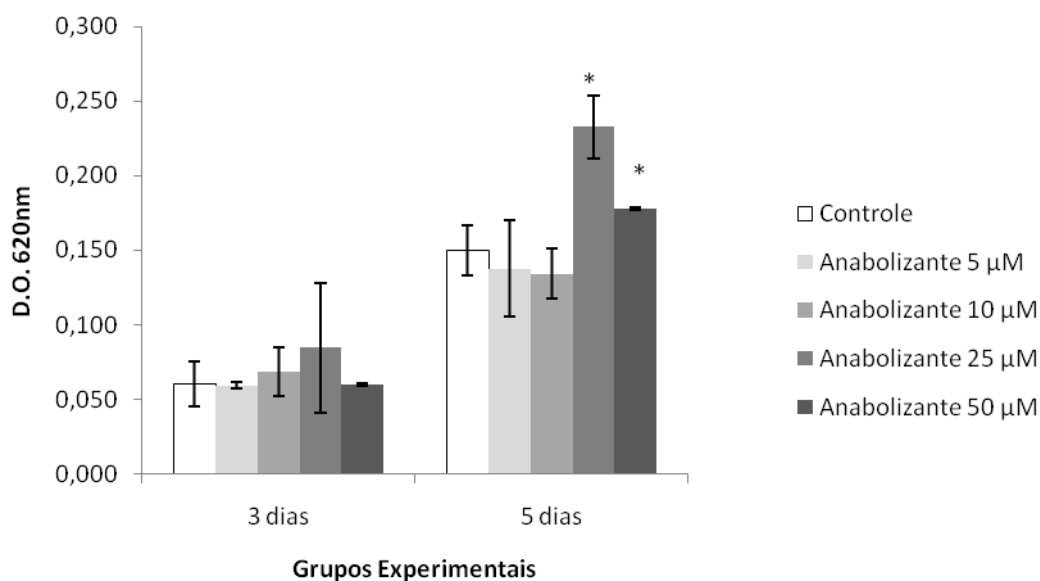


Figura 3. Avaliação da proliferação em longo prazo das células musculares cultivadas em situação de carência nutricional (simulação de lesão - 5% de SFB) por 3 e 5 dias, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações. (\*  $p \leq 0,05$ )

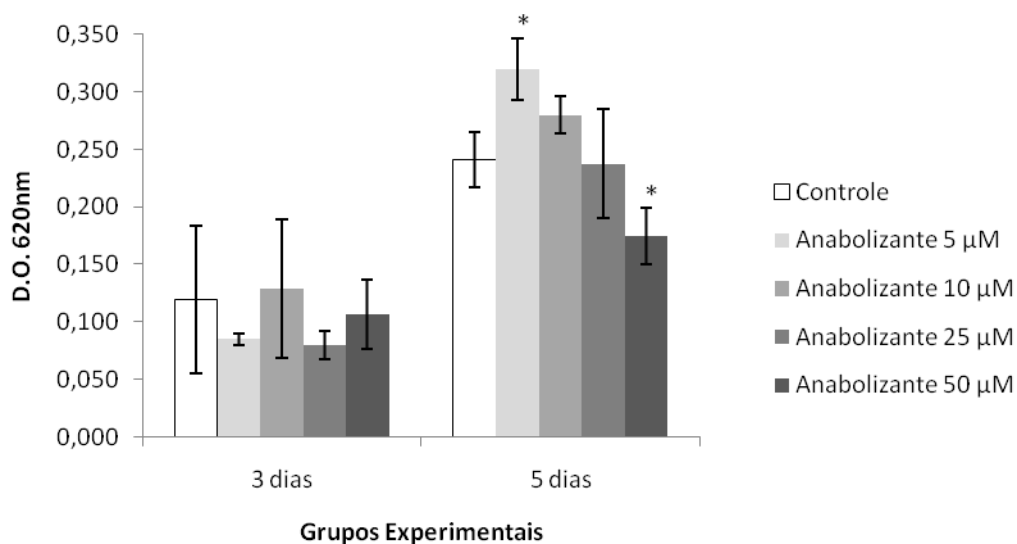


Figura 4. Avaliação da proliferação em longo prazo das células musculares cultivadas em situação em meio regular (10% de SFB) por 3 e 5 dias, na ausência (controle) e presença do anabolizante decanoato de nandrolona em diferentes concentrações. (\*  $p \leq 0,05$ )



## Discussão

A cultura celular é, por definição, um artefato, no entanto, permite que o investigador tenha um controle rigoroso sobre diversas variáveis. Portanto, estudos *in vitro* avaliando o potencial do anabolizante decanoato de nandrolona são importantes complementos dos estudos *in vivo*, e podem trazer maiores conhecimentos de forma a permitir a utilização desse recurso de forma mais eficaz e segura<sup>39</sup>. Neste estudo utilizamos a linhagem celular C2C12, pois essas células são um subclone da linhagem de mioblastos C2, isoladas de células-satélites de ratos adultos e apresentam a maioria das características dos mioblastos normais e são comumente usadas como modelo para estudar a proliferação e a diferenciação de células musculares<sup>33,34</sup>.

Até o presente momento não se encontra na literatura estudos que avaliem o efeito do anabolizante decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) sobre a expressão dos marcadores miogênicos e proliferação das células musculares C2C12. Diante disso, o presente estudo teve este objetivo avaliar este efeito em diferentes períodos e concentrações do anabolizante. Os resultados evidenciaram um aumento significativo na proliferação das células musculares tratadas com anabolizante de forma dose-dependente em ambas condições nutricionais de cultivo avaliadas, ou seja, meio regular e deficiente que mimetiza a situação de lesão muscular<sup>35,41</sup>. Este fato sugere um efeito benéfico do decanoato de nandrolona no processo de reparo muscular.

Estudos *in vivo* demonstraram que os efeitos do decanoato de nandrolona foram dependentes da musculatura avaliada, tempo de tratamento, concentração e associação ou não com exercícios, sendo todos capazes de promover o aumento da massa muscular, densidade mineral óssea, e segundo estudos o receptor de andrógeno tem grande influência nestes efeitos<sup>5,25,42,43,44</sup>. Nossos resultados estão de acordo com estes achados uma vez que a proliferação celular se alterou de forma dependente com relação aos períodos e concentrações utilizadas, sendo observado um aumento após 5 dias e nas concentrações de 50 $\mu$ M, sendo mais evidente em 25 $\mu$ M (5%SFB); 5 $\mu$ M (10%SFB) e 25 $\mu$ M na situação de carência nutricional (5%SFB) e na

concentração de 5 $\mu$ M na situação de nutrição regular (10%SFB). No mesmo período na concentração de 50  $\mu$ M do anabolizante verificamos uma redução em relação ao grupo controle e aos demais grupos.

Estes resultados nos sugerem que na situação de carência nutricional para que haja proliferação celular a concentração do anabolizante precisa ser maior se comparado a nutrição regular. Quanto à redução verificada pode-se sugerir que em longo prazo uma concentração maior pode causar inibição da proliferação. Estes resultados poderiam ser afirmados analisando outros períodos e outras concentrações para verificar se estes resultados se confirmam.

Com relação à expressão gênica os resultados evidenciaram que não existiram alterações frente ao tratamento com o anabolizante. Porém, após 8h houve um aumento significativo na expressão de miogenina em todos os grupos experimentais o que sugere que as células após este período de adesão, foram capazes de aumentar a expressão deste marcador, sendo este relacionado com a diferenciação. Provavelmente em 2 e 4h as células ainda estariam muito envolvidas no processo de adesão e com níveis ainda baixos de marcadores relacionados com a diferenciação. Os resultados obtidos neste estudo são de difícil comparação com outros já realizados, uma vez que as células não receberam estímulo para diferenciação (soro de cavalo), como utilizado na maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, pois o intuito do presente estudo foi verificar se o anabolizante seria capaz por si só estimular este processo de diferenciação celular além da expressão do marcador. Como exemplo pode ser citado o estudo realizado por Lee (2002)<sup>42</sup> que induziu a diferenciação das células C2C12 com 3% de soro de cavalo e adicionou 10 $\mu$ M de etanol ou 10 $\mu$ M de testosterona para analisar a expressão dos marcadores miogênicos MyoD e miogenina após 12, 24 e 48 horas. Os resultados evidenciaram que a expressão de MyoD em C2C12 não foi afetada na presença de 10 $\mu$ M de testosterona mas que houve aumento da expressão da miogenina em 24 horas, indicando que os andrógenos aceleram a diferenciação dos mioblastos.

Em concordância com estes autores, no presente estudo também não foram encontradas alterações na expressão do marcador MyoD na presença do decanoato de nandrolona, derivado da testosterona. Não é possível a

comparação da expressão da miogenina uma vez que esta foi avaliada mais precocemente (até 8h) não sendo verificadas alterações significativas, e também por que em nosso estudo não induzimos a diferenciação com soro de cavalo.

Já foi relatado por Lewis et al (2007)<sup>45</sup> que a expressão da miogenina está aumentada no músculo esquelético que sofreu uma lesão e está em processo de regeneração, o que deixa claro que a miogenina é um fator importante no processo de reparação e de diferenciação dos mioblastos.

Com relação à lesão muscular, a administração do decanoato de nandrolona em ratos com lesão causada por miotoxina (bupivacaína), foi verificado um aumento da expressão da MyoD em 14 dias após lesão sugerindo que o anabolizante, neste caso, poderia alterar a proliferação das células satélites e assim o processo de regeneração muscular<sup>46</sup>. Em nosso estudo mimetizamos a lesão muscular com carência nutricional (5%SFB) verificamos um aumento da proliferação e a expressão do marcador MyoD no período analisado não apresentou alteração uma vez que foi avaliado precocemente (8h).

Talvez a avaliação dos marcadores miogênicos influenciados pela ação do anabolizante decanoato de nandrolona na concentração utilizada neste estudo devesse ser avaliada em outros períodos, como descrito em vários trabalhos.

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que os receptores de andrógenos são a via necessária para que ocorra o desenvolvimento do músculo esquelético e a manutenção da massa e força muscular, devido a constante síntese protéica<sup>47</sup>. Wannenes et al<sup>48</sup> verificaram que durante a proliferação dos mioblastos C2C12 a expressão do receptor de andrógenos foi conseguida utilizando em cultura das dosagens de testosterona 0,1 nM, 1 nM e 10 nM, sugerindo que nesta fase as células do músculo esquelético possam ser capazes para aumentar a sua capacidade de resposta ao andrógeno também na presença de baixa concentração de hormônios. Nossos resultados estão de acordo com este estudo uma vez que houve o aumento da proliferação das células musculares precursoras nas concentrações mais baixas do decanoato de nandrolona enquanto que na concentração mais alta

utilizada (50 $\mu$ M) houve uma redução significativa na proliferação destas células.

A ação dos andrógenos na regulação da função das células satélites tem sido considerada positiva sobre o tamanho e a força muscular, principalmente no aspecto clínico, sendo os andrógenos frequentemente utilizados para aumentar a massa muscular em homens com deficiência muscular<sup>19,49,50</sup>.

O efeito do decanoato de nandrolona também foi avaliado em células endoteliais humanas (HUVECs), por D'Ascenzo et al (2007)<sup>1</sup> para verificar a capacidade sobre a proliferação, apoptose e da concentração de cálcio intracelular e observaram que na concentração de 9 $\mu$ M o decanoato de nandrolona inibiu a proliferação celular, sendo que nesta dosagem cerca de 18% destas células cultivadas por 72 horas entraram em apoptose com aumento significativo de cálcio intra celular.

Com base no exposto, fica evidente que o potencial terapêutico do anabolizante esteróide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) frente à células progenitoras miogênicas está longe de ser estabelecido em virtude de novas aplicações serem adicionadas regularmente ao seu repertório. Desta forma, novos estudos para o estabelecimento dos mecanismos celulares desencadeados pelo decanoato de nandrolona deverão ser realizados de forma a compreender melhor o papel dos andrógenos na diferenciação muscular, organização e reparo muscular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ESTUDO 2

1. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Sacconi-Jotti G, Botre F, Carta G, Tozzi-Ciancarelli, MG, Pavan A, Dolo V. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett.* 2007;8;169(2):129-36.
2. Stuelsatz P, Pouzoulet F, Lamarre Y, Dargelos E, Poussard S, Leibovitch S, Cottin P, Veschambre P. Down-regulation of MyoD by calpain 3 promotes generation of reserve cells in C2C12 myoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285,12670-12683
3. Charge, Sophie B. P., and Michael A. Rudnicki. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol* 2004; 84: 209–238.
4. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000;218(2):115-24.
5. Diel P, Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenbach-Leschowsky U, Schänzer W, Schleipen B, Thevis M, Vollmer G, Zierau O. The prohormone 19-norandrostenedione displays selective androgen receptor modulator (SARM) like properties after subcutaneous administration. *Toxicology Letters* 2008;177:198–204.
6. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002;(50) 589-610.
7. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of Cell Biology* 2003;162(6):1135–1147.
8. Cabane C, W Englaro, K Yeow, M Ragno, B Derijard. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 284: C658-C666.
9. Parker, M.H., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 4, 497–507.
10. Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser BW, Rinkevich Y, Reshef R, et al. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev Dyn.* 2004; 231:489–502.
11. Olguin, H.C., and B.B. Olwin. 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev. Biol.* 275:375–388
12. Zammit, PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *Journal of Cell Science*, 2008;121(18): 2975-2982.
13. Müller WA. Differentiation: a central topic in developmental and cell biology. *Naturwissenschaften* 1999; 86: 457–467.
14. Chen SL, Dowhan DH, Hosking BM, Muscat GE. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 2000 May 15;14(10):1209-28.

15. Schierholt AS, Fonseca I, Silva, PV, Paiva SR, Chaves LCS, Lopes PS, Faria DA, Guimarães SEF. Análise filogenética do gene da miogenina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008;60(1):156-162.
16. Dal Pai-Silva M, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *R. Bras. Zootec.* 2007;36:21-31.
17. McClung, JM., Kristen AM, Raymond WT, Larry LL, James AC. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:1543–1552.
18. Saborido A, Vila J, Molano F, Megías A. Effect of anabolic steroids on mitochondria and sarco-tubular system of skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1991;70(3):1038-43.
19. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med.* 1996 Jul 4;335(1):1-7.
20. Wimalawansa SM, Wimalawansa SJ. A novel pharmacological approach of musculoskeletal losses associated with simulated microgravity. *J Musculoskel Neuron Interact* 2000; 11:35-4.
21. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol.* 2001 Jul;170(1):27-38.
22. Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2002;8(6) 235-243.
23. Schroeder ET, Terk M, Sattler FR. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* 2003; 285: E16–E24.
24. Chen Y, Zajac JD, MacLean HE. Androgen regulation of satellite cell function. *Journal of Endocrinology* 2005;186:21-31.
25. Frisoli, Jr A, Chaves PHM, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobin levels in elderly women with osteoporosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of gerontology.* 2005;60A(5), 648–653.
26. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA. International union of pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):782-97.
27. Wiren KM, Semirale AA, Zhang XW, Woo A, Tommasini SM, Price C, Schaffler MB, Jepsen KJ. Targeting of androgen receptor in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis: a model for compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone.* 2008;43(3):440-51.
28. Barros TS, Santos MB, Shinozaki EB, Santos JF, Marchini L. Effects of use of anabolic steroids on the masticatory system: a pilot study. *J Oral Sci.* 2008;50(1):19-24.

29. Hong MH, Sun H, Jin CH, Chapman M, Hu J, Chang W, Burnett K, Rosen J, Negro-Vilar A, Miner JN. Cell-specific activation of the human skeletal alpha-actin by androgens. *Endocrinology*. 2008;149(3):1103-12.
30. Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T, Kalimo H. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 1999; 27(1): 54-59.
31. Piedade MCB, Galhardo MS, Battlehner CN, Ferreira MA, Caldini EG, Toledo OMS. Effect of ultrasound therapy on the repair of gastrocnemius muscle injury in rats. *Ultrasonics* 2008; 48: 403–411.
32. Cunha TS, Tanno AP, Marcondes FK, Perez SEA, Silestre-Araújo HS. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(3):532-540.
33. Lai J, Pittelkow MR. Physiological effects of ultrasound mist on fibroblast. *Int J Dermatol*. 2007;46(6):587-93.
34. Hill GE, Fenwick S, Matthews BJ, Chivers RA, Southgate J. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on repair of epithelial cell monolayers in vitro. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31(12):1701-6.
35. Ferreira MPP, Fernandes, KPS, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, et al. Effect of low-energy GaAlAs and InGaAlP laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(6):901-6.
36. Verzola RMM, Mesquita RA, Peviani S, Ramos OHP, Moriscot AS, Perez SEA, Selistre-de-Araújo HS. Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Braz J Med Biol Res* 2006;39(5):621-627.
37. Durigan JLQ. Efeito de diferentes modelos experimentais sobre a expressão gênica e a atividade de metaloproteases no músculo esquelético – São Carlos UFSCar – 2008.
38. Geng J, Peng F, Xiong F, Shang Y, Zhao C, Li W, Zhang C. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009;11:1-14.
39. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J Athl Train* 2002;37(3):293–299.
40. Marqueti RC, Parizotto NA, Chriguier RS, Perez SEA, Selistre-de-Araujo HS. 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* 2006; 34(8) 1274-1280.
41. Shefer, G., Barash, I., Oron, U., and Halevy, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim. - Biophys. Acta*. (2003). 1593, 131–139.
42. Lee DK. Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294(2):408-13.
43. Lewis, Michael I., Mario Fournier, Amelia Y. Yeh, Paul E. Micevych, and Gary C. Sieck. Alterations in diaphragm contractility after nandrolone administration: an analysis of potential mechanisms. *J. Appl. Physiol*. 1999 86(3):985–992.
44. Johansen KL, Painter PL, Sakkas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T. Effects of resistance exercise training and nandrolone decanoate on

- body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: a randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2307–2314.
45. Lewis MI, Fournier M, Storer TW, Bhasin S, Porszasz J, Ren SG, Da X, Casaburi R. Skeletal muscle adaptations to testosterone and resistance training in men with COPD. *J Appl Physiol*. 2007 Oct;103(4):1299-310. Epub 2007 Aug 2.
  46. White JP, Baltgalvis KA, Sato S, Wilson LB, Carson JA Effect of nandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced muscle injury. *J Appl Physiol*. 2009 Nov;107(5):1420-30. Epub 2009 Sep 10.
  47. Herbst, K.L., Bhasin, S., 2004. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 271–277.
  48. Wannenes F, Caprio M, Gatta L, A Fabbri, Bonini S, Moretti C. Androgen receptor expression during C2C12 skeletal muscle cell line differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;292:11-9.
  49. Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, J., et al. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997 82, 407–413
  50. Bhasin, S., Storer, T.W., Javanbakht, M., Berman, N., Yarasheski, K.E., Phillips, J., et al. Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. *JAMA*, 2000; 283, 763–770.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu concluir que o anabolizante esteróide decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) promoveu um aumento estatisticamente significativo na proliferação das células musculares tratadas com anabolizante na concentração de 5 e 25µM com relação às demais concentrações e ao controle, na situação de nutrição regular e na simulação de lesão respectivamente. Contudo, em concentrações mais altas do anabolizante, houve uma redução significativa desta proliferação.

Com relação a expressão gênica foi verificado que após 8 horas da incubação os mioblastos C2C12 apresentaram um aumento na expressão da miogenina em comparação ao controle enquanto que a expressão de MyoD não sofreu alteração nos períodos e grupos avaliados. O anabolizante induziu aumento de proliferação das células musculares a longo prazo de forma dose dependente e, além disso, houve aumento na expressão de miogenina após 8h em todos os grupos avaliados.

O decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin®) nas concentrações utilizadas, não foi capaz de alterar a viabilidade e proliferação celular em curto prazo, avaliada pelo método MTT, entre as células musculares tratadas e as células controle tanto na situação de carência nutricional (5% de SFB), quanto na condição de cultivo em meio regular (10% de SFB). Da mesma forma frente à adesão celular, não houve alteração na presença do anabolizante, após os diferentes períodos de incubação avaliados.

Como o anabolizante decanoato de nandrolona é um recurso que continua sendo largamente utilizado tanto na prática esportiva quanto terapêutica com o objetivo de acelerar o ganho de massa muscular e de reabilitação do músculo esquelético, respectivamente, o melhor entendimento dos possíveis efeitos do anabolizante sobre as células musculares no processo de diferenciação celular, garante o estabelecimento de um protocolo mais adequado na utilização dos pacientes com indicação no uso deste recurso visando um melhor reparo muscular e recuperação clínica dos pacientes.

A utilização do anabolizante como indicação terapêutica está associada à sarcopenia, doença pulmonar obstrutiva crônica com alteração

de musculatura diafragmática, lesões musculares pós-trauma, pós lesão neurológica, além de outros quadros clínicos como osteoporose, anemia, carcinoma mamário. O estabelecimento das dosagens e entendimento na ação destes anabolizantes na musculatura esquelética proporcionará um tratamento com maior segurança e melhor resposta muscular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 1994; 22(5): 702-710.
2. Charge SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84(1): 209–238.
3. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20:1692–708.
4. Cabane C, W Englaro, K Yeow, M Ragno, B Derijard. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 284: C658-C666.
5. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002;(50) 589-610.
6. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of Cell Biology* 2003;162(6):1135–1147.
7. Foschini, RMSA, Ramalho, FS, Bicas, HEA. Células satélites musculares. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2004;67(4):681-7.
8. Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-a regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005;280(45):37782–9.
9. Joulia D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res.* 2006;312(13):2401-14.
10. Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: Evidence for TWEAK-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007;282(20):15000-10.
11. Zammit, PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *Journal of Cell Science*, 2008;121(18): 2975-2982.
12. Kook, SH, Lee HJ, Chung WT, Hwang IH, Lee SA, Kim BS, Lee JC. Cyclic mechanical stretch stimulates the proliferation of c2c12 myoblasts and inhibits their differentiation via prolonged activation of p38 MAPK. *Mol. Cells*, 2008; 25(4):479-486.
13. Stuelsatz P, Pouzoulet F, Lamarre Y, Dargelos E, Poussard S, Leibovitch S, Cottin P, Veschambre P. Down-regulation of MyoD by calpain 3 promotes generation of reserve cells in C2C12 myoblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285,12670-12683.
14. Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in cell & dev. Biol.* 2005;16:575-584.
15. Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res.* 2003;286(2):263-75.

16. Lluri G, Jaworski DM. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle Nerve*. 2005 October ; 32(4): 492–499.
17. Chen SL, Dowhan DH, Hosking BM, Muscat GE. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*. 2000 May 15;14(10):1209-28.
18. Schierholt AS, Fonseca I, Silva, PV, Paiva SR, Chaves LCS, Lopes PS, Faria DA, Guimarães SEF. Análise filogenética do gene da miogenina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2008;60(1):156-162.
19. Dal Pai-Silva M, Carvalho RF. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *R. Bras. Zootec*. 2007;36:21-31.
20. Müller WA. Differentiation: a central topic in developmental and cell biology. *Naturwissenschaften* 1999; 86: 457–467.
21. McClung, JM., Kristen AM, Raymond WT, Larry LL, James AC. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:1543–1552.
22. Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2002;8(6) 235-243.
23. Chen SL, Dowhan DH, Hosking BM, Muscat GE. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*. 2000 May 15;14(10):1209-28.
24. Saborido A, Vila J, Molano F, Megías A. Effect of anabolic steroids on mitochondria and sarco-tubular system of skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1991;70(3):1038-43.
25. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*. 1996 Jul 4;335(1):1-7.
26. Wimalawansa SM, Wimalawansa SJ. A novel pharmacological approach of musculoskeletal losses associated with simulated microgravity. *J Musculoskel Neuron Interact* 2000; 11:35-4.
27. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol*. 2001 Jul;170(1):27-38.
28. Schroeder ET, Terk M, Sattler FR. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003; 285: E16–E24.
29. Frisoli, Jr A, Chaves PHM, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. The effect of nandrolone decanoate on bone mineral density, muscle mass, and hemoglobin levels in elderly women with osteoporosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of gerontology*. 2005;60A(5), 648–653.
30. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, Hochberg RB, McKay L, Renoir JM, Weigel NL, Wilson EM, McDonnell DP, Cidlowski JA. International union of pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):782-97.
31. Wiren KM, Semirale AA, Zhang XW, Woo A, Tommasini SM, Price C, et al. Targeting of androgen receptor in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis: a model for compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone*. 2008;43(3):440-51.

32. Barros TS, Santos MB, Shinozaki EB, Santos JF, Marchini L. Effects of use of anabolic steroids on the masticatory system: a pilot study. *J Oral Sci.* 2008;50(1):19-24.
33. Hong MH, Sun H, Jin CH, Chapman M, Hu J, Chang W, Burnett K, Rosen J, Negro-Vilar A, Miner JN. Cell-specific activation of the human skeletal alpha-actin by androgens. *Endocrinology.* 2008;149(3):1103-12.
34. Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285:E197–E205.
35. Wu FCW. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clinical Chemistry* 1997; 43:7:1289–1292.
36. Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, et al. Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(9):7786–7792.
37. Wannenes F, Caprio M, Gatta L, A Fabbri, Bonini S, Moretti C. Androgen receptor expression during C2C12 skeletal muscle cell line differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;292:11-9.
38. Diel P, Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudenbach-Leschowsky U, Schänzer W, Schleipen B, et al. The prohormone 19-norandrostenedione displays selective androgen receptor modulator (SARM) like properties after subcutaneous administration. *Toxicology Letters* 2008;177:198–204.
39. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions molecular. *Endocrinology* 2002; 16(10):2181–2187.
40. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.* 2005;105(9): 3352–3370.
41. Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2004;89(10):5245-5255.
42. Saartok T, Dahlberg E, Gustafsson JA. Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology.* 1984;114(6):2100-6.
43. Lee DK. Androgen receptor enhances myogenin expression and accelerates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(2):408-13.
44. National Institute on Drug Abuse. <http://www.nida.nih.gov/>
45. Cunha TS, Tanno AP, Marcondes FK, Perez SEA, Silestre-Araújo HS. A administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(3)532-540.
46. Fermo RS, Rego J NI, Franquini JVM, Andrade TU. Effect of food supplementation over anabolic action of nandrolone decanoate on rats. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2008; 5(1), 111-121.
47. Lise, MLZ; Gama e Silva, TS da; Ferigolo, M, Barros, HMT. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1999, vol.45, n.4, pp. 364-370.
48. White JP, Baltgalvis KA, Sato S, Wilson LB, Carson JA Effect of nandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced

muscle injury. *J Appl Physiol*. 2009 Nov;107(5):1420-30. Epub 2009 Sep 10.

49. Marqueti RC, Prestes J, Wang CC, Ramos OH, Perez SE, Nakagaki WR, et al. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. *2010 Scand J Med Sci Sports*.
50. Sardar P, Jha A, Roy D, Majumdar U, Guha P, Roy S, Banerjee R, Banerjee AK, Bandyopadhyay D. Therapeutic effects of nandrolone and testosterone in adult male HIV patients with AIDS wasting syndrome (AWS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *HIV Clin Trials*. 2010 Jul-Aug;11(4):220-9.
51. Tengstrand B, Cederholm T, Söderqvist A, Tidermark J. Effects of protein-rich supplementation and nandrolone on bone tissue after a hip fracture. *Clin Nutr*. 2007 Aug;26(4):460-5. Epub 2007 May 11.
52. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5a ed. New York (NY): Wiley-Liss; 2005.
53. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Sacconi-Jotti G, Botre F, Carta G, Tozzi-Ciancarelli MG, Pavan A, Dolo V. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett*. 2007;8;169(2):129-36.
54. Yin D, Gao W, Kearbey JD, XU H, Chung K, He Y, et al. Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 March; 304(3): 1334–1340.
55. Baker KG, Robertson VL, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther* 2001;81(7):1351-1358.
56. Johns LD. Nonthermal Effects of Therapeutic Ultrasound: The Frequency Resonance Hypothesis. *J Athl Train* 2002;37(3):293–299.

## ANEXO 1: Protocolo de submissão do artigo para a Revista Brasileira de Fisioterapia

ESTUDO 1: “Efeitos do anabolizante deca-durabolin® sobre a proliferação e adesão de células musculares”

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Submissões Ativas](#)

### Submissões Ativas

ATIVO		ARQUIVO		
ID	MM-DD ENVIAR SEC	AUTORES	TÍTULO	STATUS
RBFIS 06-30 -739	ARTORIG	Oliveira, Artilheiro, da Silva,...	EFEITOS DO ANABOLIZANTE DECA- DURABOLIN® SOBRE A...	EM AVALIAÇÃO
1 a 1 de 1 Itens				
<p><b>Iniciar Nova Submissão</b></p> <p><a href="#">CLIQUE AQUI</a> para iniciar os cinco passos do processo de Submissão.</p>				

---

**Revista Brasileira de Fisioterapia**  
 Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310  
 São Carlos - São Paulo - Brasil - CEP 13565-905  
 Telefone: +55-16-3351-8755

---

## ANEXO 2: Protocolo de submissão do artigo para a Revista Brasileira de Fisioterapia

Estudo 2: “Efeito do anabolizante decanoato na expressão de marcadores miogênicos e proliferação das células musculares a longo prazo”



English | Español | Português  
 Usuário Logado: **elisangelanascimento**  
[Sair do sistema](#)

[Página inicial](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > **Submissões Ativas**

### Submissões Ativas

ATIVO		ARQUIVO		
ID	MM-DD ENVIAR SEC	AUTORES	TÍTULO	STATUS
RBFIS 11-23 -891		ARTORIG Oliveira	<a href="#">EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA...</a>	Aguardando designação

1 a 2 de 2 Itens

**Iniciar Nova Submissão**  
[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de Submissão.

**Revista Brasileira de Fisioterapia**  
 Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310  
 São Carlos - São Paulo - Brasil - CEP 13565-905  
 Telefone: +55-16-3351-8755