

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

**“EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA
EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS E NO PROCESSO DE
REPARO MUSCULAR APÓS CRIOLEÇÃO”.**

ROBERTO FARINA PIOVESAN

São Paulo

2010

ROBERTO FARINA PIOVESAN

**“EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA
EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS E NO PROCESSO DE
REPARO MUSCULAR APÓS CRIOLEÇÃO”.**

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-orientadoras: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes
Prof. Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Piovesan, Roberto Farina.

Efeito do Anabolizante Decanoato de Nandrolona na Expressão de Marcadores Miogênicos e no Processo de Reparo Muscular Após Criolesão. Roberto Farina Piovesan. 2010.

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Lesão Muscular 2. Criolesão 3. Decanoato de Nandrolona 4. Myod 5. Miogenina

CDU : 615.8

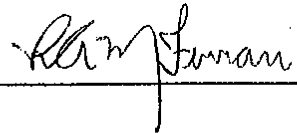
São Paulo, 16 de dezembro de 2010.

TERMO DE APROVAÇÃO

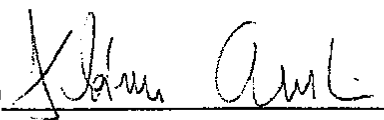
Aluno: ROBERTO FARINA PIOVESAN

Título da Dissertação: "EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS CRIOLESÃO".

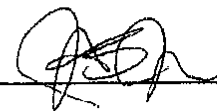
Presidente PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR



DEDICATÓRIA

Dedico com todo meu coração em especial a DEUS acima de tudo que é meu senhor e salvador;

A toda minha família e minha noiva que me ajudaram a tornar essa etapa da minha vida, uma realidade.

A todos meus amigos que de alguma forma estiveram presente nesse estudo; Em especial à minha orientadora Dra Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, pessoa admirável, à quem devo toda a minha trajetória, pela paciência e dedicação.

Às Dras. Manoela D. Martins e Kristianne Porta Santos Fernandes pela importante ajuda quando se fez necessário, paciência e dedicação.

Aos técnicos do laboratório, Bruno por toda sua fundamental colaboração no início da minha carreira e Tábata Santos de Oliveira pela ajuda e colaboração nos estudos.

Ao professor José Antonio da Silva Jr. pela trocas de informações que foram fundamentais para a conclusão desse projeto e pela ajuda na elaboração do projeto.

Aos amigos do mestrado Dayane Aparecida Ferrari, Paulo Dantas por toda cumplicidade.

Ao aluno de iniciação científica (IC) Agnelo Neves Alves por todo empenho e determinação durante todo o meu projeto de pesquisa.

Muito obrigado e que o Amor de DEUS esteja sempre convosco.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar o efeito do anabolizante esteróide decanoato de nandrolona sobre o reparo muscular e a expressão de marcadores miogênicos após criolesão em músculo esquelético de ratos. Foram utilizados 100 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos sendo: (1) Controle (n=10); (2) controle sham (n=10) apenas submetido a incisão e exposição do músculo tibial anterior, (3) Criolesionados e tratados com anabolizante e sacrificados após 1, 7, 14 e 21 dias (n=40); (4) Criolesionados e tratados com veículo e sacrificados após 1, 7, 14 e 21 dias (n=40). O tratamento com o anabolizante consistiu de injeções de Decanoato de nandrolona intramuscular duas vezes por semana 5mg/kg. Os animais foram sacrificados e o TA foi removido para a extração do RNA total para análise da expressão de MyoD e miogenina por PCR em tempo real e para a análise morfológica do processo de reparo utilizando a coloração com hematoxilina-eosina. Os resultados evidenciaram um aumento significativo de RNAm de MyoD no grupo 7 dias criolesionado e tratado com anabolizante quando comparado ao seu respectivo grupo sem criolesão e tratado com anabolizante e aos grupos veículo com ou sem lesão, neste mesmo período. Com relação a miogenina, após 21 dias foi possível verificar um aumento significativo em sua expressão no grupo lesão tratado com anabolizante em comparação aos demais grupos deste mesmo período. A análise morfológica permitiu verificar que após 7 dias houve ausência de edema e mionecrose e em 14 dias ausência de edema e infiltrado inflamatório somente no grupo com lesão e tratado com anabolizante em comparação aos demais grupos do mesmo período. Em conclusão, o anabolizante Decanoato de Nandrolona acelera o processo de reparo tecidual em ratos machos após criolesão e induz um aumento significativo na expressão de MyoD após 7 dias e de miogenina após 21 dias de lesão.

Palavras chaves: Lesão muscular, Criolesão, Decanoato de Nandrolona, MyoD, Miogenina.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the effect of the anabolic steroid nandrolone decanoate on muscle repair and expression of myogenic markers after cryolesion in rat skeletal muscle. We studied 100 male Wistar rats were divided into four groups: (1) Control (n = 10), (2) sham control (n = 10) only underwent incision and exposure of the anterior tibial muscle (3) and cryolesioned treated with anabolic and sacrificed after 1, 7, 14 and 21 days (n = 40), (4) cryolesioned and treated with vehicle and sacrificed after 1, 7, 14 and 21 days (n = 40). Treatment with steroid injections consisted of Nandrolone decanoate intramuscular 5mg/kg twice a week. The animals were sacrificed and the TA was removed for total RNA extraction for analysis of MyoD and myogenin by real time PCR and morphological analysis of the repair process using hematoxylin-eosin. The results showed a significant increase in MyoD mRNA in group cryolesioned 7 days and treated with steroid compared to its respective group without cryolesion and treated with steroid and vehicle groups with or without injury, this same period. With respect to myogenin, 21 days after it was verified a significant increase in expression in the injury group treated with steroid compared to other groups of that period. The morphological analysis showed that after 7 days there was no edema and myonecrosis and 14 days in the absence of edema and inflammatory infiltrate only in the injury group treated with steroid compared to other groups of the same period. In conclusion, the anabolic steroid nandrolone decanoate accelerates tissue repair in rats after cryolesion and induces a significant increase in MyoD after 7 days and myogenin after 21 days of injury.

[Ouvir](#)

[Ler foneticamente](#)

Dicionário - [Ver dicionário detalhado](#)

Keywords: Muscle Injury, Cryolesion, Decanoate Nandrolone, Myod, Myogenin.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1- CONTEXTUALIZAÇÃO | 11 |
| 2- ESTUDO 1: EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS E NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS CRIOLESÃO. | |
| Resumo..... | 15 |
| Introdução..... | 17 |
| Material e métodos | 18 |
| Tratamento com Anabolizante | 19 |
| Extração de RNA | 19 |
| Síntese de DNA e PCR (Reação de cadeia polimerase) quantitativo..... | 20 |
| Análise morfológica (Coloração por HE) | 21 |
| Análise estatística | 22 |
| Resultados | 21 |
| Discussão..... | 28 |
| 3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |
| 4- ESTUDO 2: Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional | 35 |
| Resumo..... | 36 |
| Introdução..... | 38 |
| Metodologia..... | 38 |
| Resultados..... | 39 |
| Referências bibliográficas..... | 47 |
| 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS | 51 |
| 5- ANEXO 1: Comprovante de submissão de artigo para publicação à Revista Brasileira de Fisioterapia. | 62 |

LISTA DE FIGURAS

ESTUDO 1

Figura 1: Análise do peso dos animais dos grupos experimentais. (* $p < 0,05$).

Figura 2: Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina (HE).

Figura 3: Análise semi-quantitativa pela graduação dos componentes teciduais nos diferentes grupos experimentais. Grau 0: ausente; Grau 1: discreto; Grau 2: moderado; Grau 3: intenso.

Figura 3: Análise da expressão de RNAm de MyoD nos grupos experimentais estudados (* $p < 0,05$).

Figura 5: Análise da expressão de RNAm de Miogenina nos grupos experimentais estudados (* $p < 0,05$).

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS- Anabolizante Androgênico esteróide.
C2C12- Receptores androgênicos mioblastos
CD34C- Células de receptores androgênicos
COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação animal
GH- Hormônio do crescimento
HE- Hematoxilina-eosina
ICLAS- International Council of Laboratory Animal Science
IGF1- Fator de crescimento insulina-símile
MEC- Matriz extra celular
MMP- Metalopeptidase
MYF-5- Fator miogênico
MyoD- Fator miogênico
MRF4- Fator miogênico
PCR- Reação em cadeia da polimerase
RNAm- Ácido ribonucléico
TA- Tibial anterior

1- CONTEXTUALIZAÇÃO

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos compostos por células musculares e células satélites quiescentes. Em circunstâncias normais, o músculo esquelético é um tecido estável com baixo “turnover”, ou seja, baixo remodelamento sem alterações drásticas em suas características fenotípicas¹. Porém, tem a capacidade de adaptação frente a estímulos variados tais como atividade contrátil, danos diretos (laceração, contusão e estiramento) e indiretos (isquemia e disfunção neurológica), essa capacidade de adaptação, conhecida como plasticidade muscular, fundamental para a mecânica funcional do corpo humano^{1,2,3,4,5}.

A lesão muscular é um fenômeno comum que pode ocorrer em função de exercícios físicos intensos, traumas, contusões, eletroestimulação entre outros fatores. Após a agressão, inicia-se o reparo do músculo esquelético em quatro fases interdependentes: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose. Ao longo destas fases, observa-se a ativação de diferentes tipos de células, degradação e síntese de proteínas intracelulares e dos componentes da (MEC) matriz extracelular⁶.

As lesões musculares, freqüentes dentro das práticas desportivas e em ambientes de trabalho, levam ao comprometimento de atividades ocupacionais e de lazer⁷. Estas lesões têm predominância no sexo masculino (75%) e em adultos jovens de 18-28 anos⁸. Assim, existe considerável interesse na regeneração do músculo esquelético em função de várias situações que necessitam desta como: reparo rápido, transplantes, distrofias musculares, atrofia por desuso ou permanência no espaço entre outras⁹.

Após uma lesão, o músculo tem a habilidade de iniciar um processo de reparo altamente organizado de forma a prevenir a perda de massa muscular. Este processo é semelhante à miogênese, ou seja, o processo constituído por várias etapas nas quais células precursoras ou mioblastos proliferam e então se diferenciam e se fundem para formar miotubos multinucleados^{4,10,11}. Porém, no caso de uma lesão, as células que participam inicialmente são as células satélites, ao invés das progenitoras miogênicas^{1,12}.

As células satélites estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares e constituem um subtipo de célula muscular distinto

responsável pela adaptação pós-natal, crescimento e reparo. Elas possuem uma variedade de fases potenciais, incluindo proliferação, fusão ou transdiferenciação^{13,14}.

Nos diferentes estágios da miogênese, as células expressam distintos fatores regulatórios miogênicos envolvidos neste processo de diferenciação. Desmina, Myf-5 e MyoD são expressos em estágios iniciais enquanto que a Miogenina, fator regulatório (MRF4) e miosina são expressos nos estágios mais tardios. A expressão destes fatores também é regulada por moléculas de sinalização extracelular da MEC e, também, por outros fatores envolvidos no contato célula-célula^{15,16,17,18}.

MyoD e Myf-5 desempenham papéis importantes na ativação e proliferação dos mioblastos enquanto a miogenina tem se mostrado mais importante para a diferenciação dos mioblastos enquanto MRF4 é conhecido por estar envolvido maturação de miotubos^{19,20}.

Alterações na expressão de MRFs e outras proteínas regulatórias de ciclo celular podem alterar a habilidade de regeneração do músculo esquelético após lesão. A inibição da MyoD dificulta a regeneração muscular em lesão causada por miotoxina resultando no aparecimento de um maior número de células pequenas quatro semanas após a lesão inicial. O RNAm da MyoD é induzido em fases iniciais durante a regeneração do músculo esquelético causada por injeção de cardiotoxina seguido pela indução de marcadores de diferenciação como o MRF4 e miogenina^{20,21}.

Além disso, temporalmente, o processo de reparo muscular pode ser dividido em três fases denominadas de destruição, reparo e remodelamento tecidual. Na primeira, observa-se a formação de hematomas, necrose tecidual, degeneração e resposta inflamatória celular. Na segunda nota-se fagocitose do tecido degenerado, regeneração das fibras musculares, produção tecidual e crescimento vascular. Na última fase denominada de remodelamento ocorrem os processos de maturação das fibras regeneradas e reorganização tecidual^{22,23}.

Atualmente, existe uma crescente preocupação em proporcionar um processo de reparo (regeneração) muscular mais rápido e de melhor qualidade⁴. Com o intuito de estudar a regeneração muscular e os recursos terapêuticos utilizados na reabilitação de lesões musculares, vários modelos experimentais

em animais foram desenvolvidos ^{24,25}, tais como: criolesão, miotoxina, contusão, eletroestimulação, exercício físico, desnervação, desvascularização que apresentam características próprias de resposta tecidual. O modelo de criolesão promove necrose em uma área delimitada do músculo, conseqüentemente edema e reação inflamatória ^{24,26,27,28}

O uso de anabolizante com intuito de melhora no desempenho é cada vez mais freqüente em atletas e estes apresentam grande incidência de lesões musculares em virtude da grande exigência durante o treinamento e competições. O músculo esquelético é um alvo para a ação de esteróides anabólicos afetando a massa muscular e marcadores de crescimento muscular ²¹. Substâncias ou fenômenos que melhoram o desempenho de atletas são chamados de recursos ergogênicos. Aproximadamente 24 anabolizantes androgênicos esteróides (AAS) são usados para alcançar o máximo desempenho de atletas.

A hipertrofia muscular causada por substâncias androgênicas parece estar muito relacionada à célula satélite uma vez que a análise imunohistoquímica demonstrou a expressão de receptores androgênicos em células CD34C, fibroblastos, células musculares lisas e células satélites ⁵.

O Decanoato de nandrolona, um derivado da testosterona, é um esteróide anabolizante presente em pequenas quantidades no organismo humano, geralmente comercializado como Deca-Durabolin. A nandrolona liga-se ao receptor andrógeno em maior escala do que a testosterona, porém tem menos efeito geral sobre a hipertrofia muscular e há a possibilidade de que o aumento de expressão de receptores androgênicos é importante para adaptação da fibra a sobrecarga, possivelmente por meio da regulação de proteínas de ciclo celular para a atividade das células satélites ²¹.

2. ESTUDO 1: EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA EXPRESSÃO DE MARCADORES MIOGÊNICOS NO PROCESSO DE REPARO MUSCULAR APÓS CRIOLESÃO. Effects of nandrolone decanoate on myogenic factors expression in muscle skeletal repair following cryolesion.

Piovesan, R.F¹, Alves A.N², Silva Jr JA³, Martins MD³, Albertini R³, Fernandes KPS³, Bussadori, SK³, Mesquita-Ferrari RA³

¹- Mestrando em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

²- Aluno do curso de fisioterapia da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil. (Iniciação científica).

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

Autor (s) 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

O objetivo desse estudo foi analisar o efeito do anabolizante esteróide decanoato de nandrolona sobre o reparo muscular e a expressão de marcadores miogênicos após criolesão em músculo esquelético de ratos. Foram utilizados 100 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos sendo: (1) Controle (n=10); (2) controle sham (n=10) apenas submetido a incisão e exposição do músculo tibial anterior, (3) Criolesionados e tratados com anabolizante e sacrificados após 1, 7, 14 e 21 dias (n=40); (4) Criolesionados e tratados com veículo e sacrificados após 1, 7, 14 e 21 dias (n=40). O tratamento com o anabolizante consistiu de injeções de Decanoato de nandrolona intramuscular duas vezes por semana 5mg/kg. Os animais foram sacrificados e o TA foi removido para a extração do RNA total para análise da expressão de MyoD e miogenina por PCR em tempo real e para a análise morfológica do processo de reparo utilizando a coloração com hematoxilina-eosina. Os resultados evidenciaram um aumento significativo de RNAm de MyoD no grupo 7 dias criolesionado e tratado com anabolizante quando comparado ao seu respectivo grupo sem criolesão e tratado com anabolizante e aos grupos veículo com ou sem lesão, neste mesmo período. Com relação a miogenina, após 21 dias foi possível verificar um aumento significativo em sua expressão no grupo lesão tratado com anabolizante em comparação aos demais grupos deste mesmo período. A análise morfológica permitiu verificar que após 7 dias houve ausência de edema e mionecrose e em 14 dias ausência de edema e infiltrado inflamatório somente no grupo com lesão e tratado com anabolizante em comparação aos demais grupos do mesmo período. Em conclusão, o anabolizante Decanoato de Nandrolona acelera o processo de reparo tecidual em ratos machos após criolesão e induz um aumento significativo na expressão de MyoD após 7 dias e de miogenina após 21 dias de lesão.

Palavras chaves: Lesão muscular, criolesão, Decanoato de Nandrolona, MyoD, Miogenina.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the effect of the anabolic steroid nandrolone decanoate on muscle repair and expression of myogenic markers after cryolesion in rat skeletal muscle. We studied 100 male Wistar rats were divided into four groups: (1) Control (n = 10), (2) sham control (n = 10) only underwent incision and exposure of the anterior tibial muscle (3) and cryolesioned treated with anabolic and sacrificed after 1, 7, 14 and 21 days (n = 40), (4) cryolesioned and treated with vehicle and sacrificed after 1, 7, 14 and 21 days (n = 40). Treatment with steroid injections consisted of Nandrolone decanoate intramuscular 5mg/kg twice a week. The animals were sacrificed and the TA was removed for total RNA extraction for analysis of MyoD and myogenin by real time PCR and morphological analysis of the repair process using hematoxylin-eosin. The results showed a significant increase in MyoD mRNA in group cryolesioned 7 days and treated with steroid compared to its respective group without cryolesion and treated with steroid and vehicle groups with or without injury, this same period. With respect to myogenin, 21 days after it was verified a significant increase in expression in the injury group treated with steroid compared to other groups of that period. The morphological analysis showed that after 7 days there was no edema and myonecrosis and 14 days in the absence of edema and inflammatory infiltrate only in the injury group treated with steroid compared to other groups of the same period. In conclusion, the anabolic steroid nandrolone decanoate accelerates tissue repair in rats after cryolesion and induces a significant increase in MyoD after 7 days and myogenin after 21 days of injury.

Keywords: Muscle Injury, Cryolesion, Nandrolone decanoate, Myod, Miogenin.

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. Após uma lesão, o músculo inicia um processo de reparo altamente organizado semelhante à miogênese, porém, as células que participam são as células satélites, ao invés das progenitoras miogênicas ^{1,2,3}.

As células satélites, após a ativação, passam por uma série de estágios que envolvem proliferação, diferenciação em mioblastos e fusão as miofibras para reparar o dano muscular ^{4,5,6}. Nestes diferentes estágios, as células musculares expressam distintos fatores regulatórios miogênicos como Desmina, Myf-5 e MyoD que são expressos em estágios iniciais enquanto a miogenina, fator regulatório de miogenina (MRF4) e miosina são expressos nos estágios mais tardios ^{7,8,9,10}.

O Decanoato de nandrolona, um derivado da testosterona, é um esteróide anabolizante presente em pequenas quantidades no organismo humano, geralmente comercializado como Deca-Durabolin. A nandrolona liga-se ao receptor andrógeno em maior escala do que a testosterona, porém tem menos efeito geral sobre a hipertrofia muscular e há a possibilidade de que o aumento de expressão de receptores androgênicos é importante para adaptação da fibra a sobrecarga, possivelmente por meio da regulação de proteínas de ciclo celular para a atividade das células satélites ¹¹.

O uso de anabolizante com intuito de melhora no desempenho é cada vez mais freqüente em atletas e estes apresentam grande incidência de lesões musculares em virtude da grande exigência durante o treinamento e competições. O músculo esquelético é um alvo para a ação de esteróides anabólicos afetando a massa muscular e marcadores de crescimento muscular ¹². Substâncias ou fenômenos que melhoram o desempenho de atletas são chamados de recursos ergogênicos. Aproximadamente 24 anabolizantes

androgênicos esteróides (AAS) são usados para alcançar o máximo desempenho de atletas.

Desta forma o objetivo deste presente estudo foi avaliar o efeito do uso do esteróide anabolizante decanoato de nandrolona na expressão dos fatores miogênicos MyoD e miogenina e no reparo do tecido muscular esquelético de ratos após criolesão.

METODOLOGIA

A metodologia utilizada neste estudo foi elaborada atendendo às resoluções 879/2008, lei 11794 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINOVE, número AN 0012/2009.

ANIMAIS

Foram utilizados 100 ratos Wistar, machos, divididos aleatoriamente nos seguintes grupos (1) Controle (n=10); (2) controle sham (n=10) apenas submetido à incisão e exposição do músculo tibial anterior, (3) Criolesionado e tratado com anabolizante sacrificados após 1, 7,14 e 21 dias (n=10); (4) Criolesionado e tratado apenas com veículo do anabolizante e sacrificado após 1, 7, 14 e 21 dias (n=10);

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados após os animais terem sido anestesiados com injeção intramuscular de anestésico geral injetável a base de Ketamina (Dopalen) e de Xilazina (Anasedan). O modelo de criolesão que foi utilizado está de acordo com o descrito por Miyabara et al (2005)¹³. O músculo TA foi exposto cirurgicamente e a criolesão foi realizada por meio de duas aplicações (duração de 10 segundos cada), utilizando bastão metálico de extremidade plana, previamente resfriado em nitrogênio líquido, diretamente na musculatura. O bastão metálico que foi utilizado no músculo TA foi de 0.4cm x 0.4cm. Após o procedimento foi realizada a sutura das áreas incisadas utilizando-se fio de poliamida (6,0) e os animais foram mantidos em gaiolas com aquecimento para prevenir a hipotermia.

Tratamento com Anabolizante e Veículo (Óleo de Amendoim e Álcool Benzílico).

O tratamento com o Anabolizante androgênico esteróide (AAS) foi realizado de acordo com o descrito por Marquetti et al (2008)⁶. Os animais receberam injeções de Deca-Durabolin® (decanoato de nandrolona; Organon do Brasil, São Paulo, Brazil); 5mg/kg peso (dose suprafisiológica) subcutaneamente na região dorsal do animal, duas vezes por semana (como utilizado frequentemente por atletas). Os grupos controle receberam injeção apenas do veículo do anabolizante (óleo de amendoim e álcool benzílico na proporção de 1: 1 ½ respectivamente).

Extração de RNA total

Para este procedimento foram utilizados 80-100mg do músculo removido. O tecido foi homogenizado em reagente TRIzol (Invitrogen) e o isolamento do RNA total foi obtido seguindo as orientações do fabricante. Para verificação do sucesso do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%.

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 (Diethyl 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 MgCl₂, 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 utilizado 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'; MyoD senso 5' GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC e anti-senso AGC ACC TGG TAA ATC GGA TTG (produto de amplificação: 80pb) ; Miogenina - senso 5'ACTACCCACCGTCCATTAC- 3' e anti-senso 3'TCGGGGCACTCACTGTCTCT 5' (produto 233) ^{14,15}. Os valores quantitativos para RNAm de MyoD, miogenina e GAPDH foram obtidos a partir do número de ciclos (CT – treshold 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. Δ 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 Δ Ct como dados relativos devido a esta característica logarítmica, o parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizada para expressar os dados de expressão relativa.

Análise morfológica

Após o sacrifício dos animais, os músculos TA (controle e tratado) foram cuidadosamente dissecados, divididos em dois fragmentos, proximal e distal, imediatamente resfriados em isopentano por 10 segundos e congelados a seguir em nitrogênio líquido ¹⁵. Os fragmentos musculares foram posicionados

de modo a fornecer, durante a microtomia cortes transversais. Esses materiais foram armazenados em freezer -70°C .

Cortes seriados de $10\ \mu\text{m}$ foram obtidos em criostato da marca LEICA no laboratório de neuroanatomia da Universidade de São Paulo (USP) no Instituto de Ciências Biológicas III (ICBIII), à temperatura de -20°C , coletados em lâminas de vidro silanizadas e submergidos em acetona e secos à temperatura ambiente por 10 minutos em cada etapa.

Para análise morfológica utilizou-se coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz (microscópio Axioplan 2 Zeiss).

Os critérios morfológicos utilizados para avaliar as etapas do remodelamento tecidual foram a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose, fibras com núcleos centralizados e fibras com nucléolos proeminentes¹⁶.

Análise qualitativa

As análises qualitativas das lâminas foram realizadas em microscopia de luz convencional por dois examinadores previamente calibrados.

A análise qualitativa dos cortes histológicos corados em HE compreenderá a descrição das etapas do remodelamento tecidual envolvendo a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, edema, necrose, fibras novas e imaturas. A análise semi-quantitativa consistiu na graduação dos componentes teciduais descritos acima em ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3) de acordo com¹⁶.

Análise estatística

Foram calculadas as médias e desvios-padrão para os diferentes grupos e as comparações entre eles foram feitas utilizando a análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett foi 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, EUA).

Resultados

Análise do peso dos animais

A análise dos pesos dos animais durante todo o período experimental permitiu verificar que os animais apresentaram aspecto saudável, sem manifestação de inflamações e distúrbios locomotores. Em nosso estudo verificou que apenas os animais do grupo 14 dias tratado com o anabolizante decanoato de nandrolona apresentaram aumento significativo do peso ao final do protocolo experimental, ou seja, o dia da eutanásia (figura 1). Nos demais períodos não houve diferenças significativas entre o peso final e inicial em todos os grupos experimentais avaliados (figura 1).

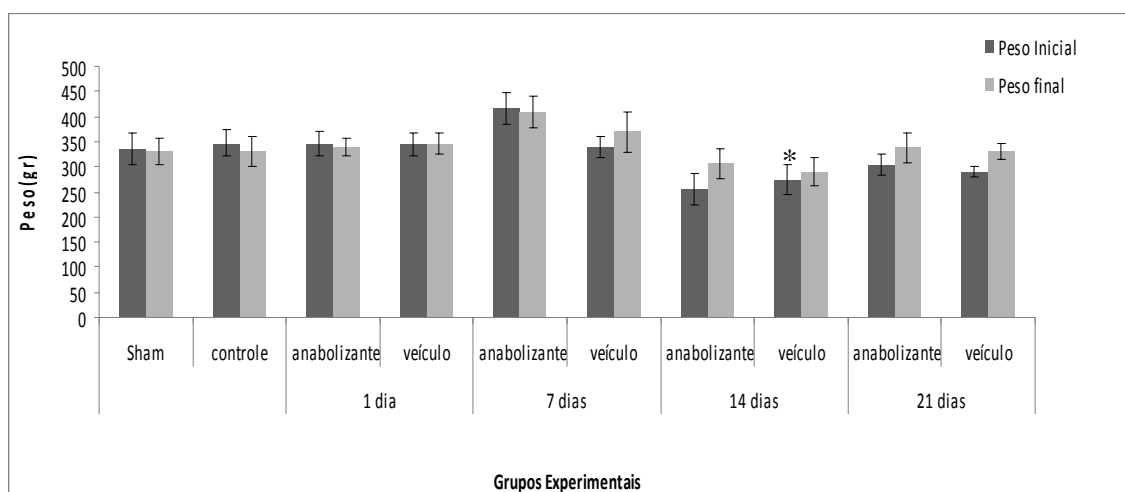


Figura 1: Análise do peso dos animais dos grupos experimentais. (* $p < 0,05$).

Análise Morfológica Qualitativa

A análise morfológica qualitativa permitiu verificar que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal com presença de fibras com núcleos periféricos, sem sinais de lesão ou processo inflamatório (Figura 2a). Esses resultados foram semelhantes aos observados no grupo veículo controle e anabolizante controle em todos os períodos experimentais.

O grupo *sham* mostrou discreto infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, poucas células musculares degeneradas (mionecrose) e focos de edema situados em região superficial do músculo exposto cirurgicamente.

O grupo criolesionado, veículo criolesionado e anabolizante criolesionado após 1 dia mostraram resultados semelhantes demonstrando intenso edema entre as fibras musculares, moderado infiltrado inflamatório com neutrófilos e macrófagos dispersos por entre as fibras. Estas por sua vez, apresentavam-se em grande parte necróticas (mionecrose) (Figura 2b).

Após 7 dias, o grupo criolesionado e veículo criolesionado mostraram redução do processo inflamatório, escassa mionecrose e o surgimento de inúmeras fibras musculares novas e imaturas (Figura 2c). Neste mesmo período o grupo anabolizante criolesionado mostrou fibras musculares com maior grau de maturação associado à redução do edema e da mionecrose. (Figura 2d).

Após 14 dias, o grupo criolesionado, veículo criolesionado e anabolizante criolesionado mostraram aspecto morfológico do reparo semelhante com redução do edema e do infiltrado inflamatório. Reposição de toda a área criolesionada por células musculares com núcleo centralizado cortadas (separadas) indicando renovação tecidual (Figura 2e).

Aos 21 dias o grupo criolesionado, veículo criolesionado e anabolizante criolesionado exibiram tecido muscular com aspecto morfológico normal evidenciando o reparo completo sem sinais inflamatórios e raras células com núcleo centralizado (Figura 2f).

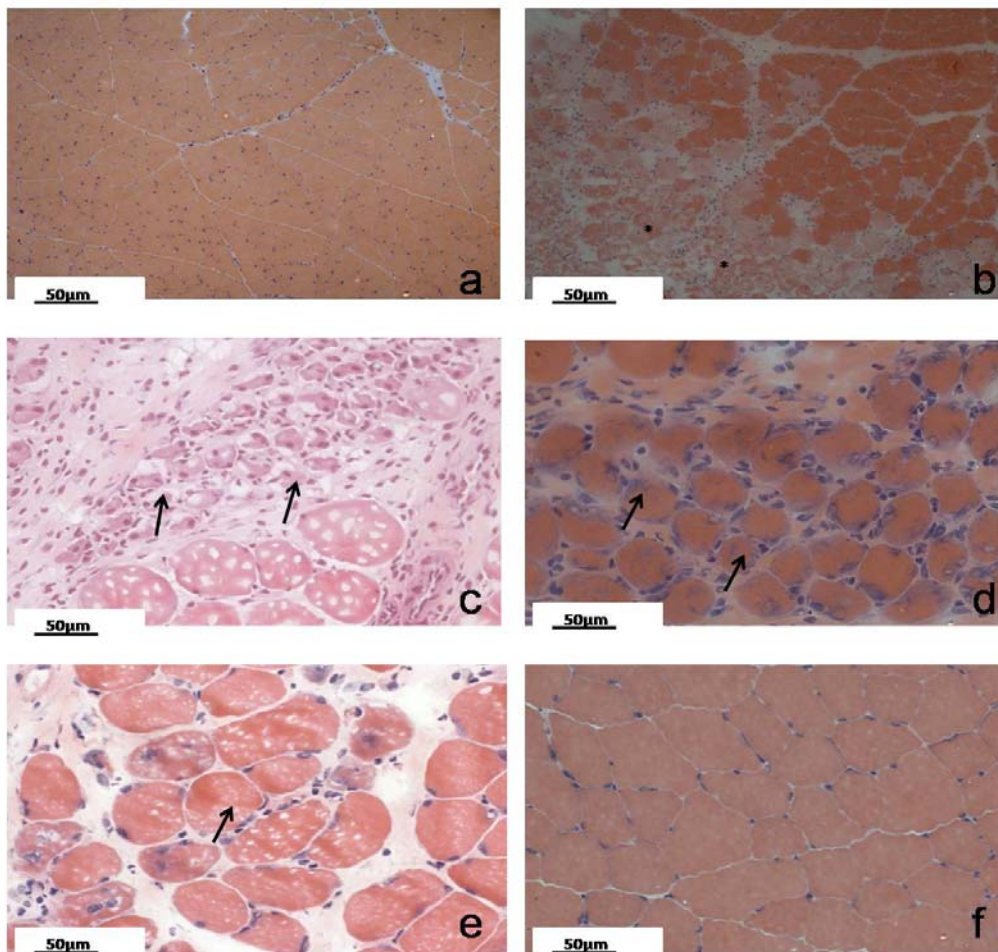


Figura 2: Fotomicrografias dos cortes histológicos de músculos corados por hematoxilina & eosina. (a) Músculo controle exibindo morfologia normal (aumento original, 100x). (b) Área criolesionada após 1 dia (aumento original, 400x). Nota-se a presença de mionecrose (*) e infiltrado inflamatório. (c) Área criolesionada após 7 dias mostrando menor grau de mionecrose, de infiltrado inflamatório e de edema. Nota-se início da migênese (setas) (aumento original, 200x). (d) Músculo criolesionado e com anabolizante após 7 dia. Miogênese exibindo miotúbulos (setas) com maior grau de maturação quando comparado aos demais grupos. (aumento original, 400x). (e) Aos 14 dias observam-se células musculares regeneradas, porém imaturas cortadas (seta) (aumento original, 400x). (f) Aos 21 dias notam-se células musculares maduras, maiores, de aspecto poligonal (aumento original, 400x).

Análise Morfológica Semi-quantitativa

A análise morfológica semi-quantitativa permitiu verificar que os músculos do grupo controle apresentaram aspecto histológico normal e ausência dos aspectos infiltrado inflamatório, edema, mionecrose e presença de fibras novas e imaturas relacionados ao reparo após lesão, como esperado (figura 3).

O grupo *sham* apresentou edema, mionecrose e infiltrado inflamatório em grau 1 enquanto a presença de fibras novas e imaturas não foi verificada (figura 3).

Os animais do período 1 dia apresentaram edema, mionecrose e infiltrado inflamatório em todos os grupos analisados, sendo graduados entre moderado e intenso (figura 3).

Após 7 dias houve ausência de edema e mionecrose somente no grupo com lesão e tratado com anabolizante enquanto os grupos lesão e lesão tratado com o veículo do anabolizante apresentaram discreto edema e mionecrose. Com relação ao infiltrado inflamatório houve redução no grupo tratado com anabolizante (discreto) quando comparado aos demais grupos (grau moderado). Fibras novas e imaturas foram identificadas em todos os grupos deste período em grau intenso (figura 3).

Em 14 dias houve ausência de edema e infiltrado inflamatório apenas no grupo tratado com o anabolizante em comparação aos demais grupos do mesmo período. A mionecrose não foi verificada em nenhum grupo enquanto as fibras novas imaturas foram evidenciadas em todos os grupos sendo em grau discreto (1) no grupo tratado com anabolizante e grau moderado no grupo criolesionado tratado com o veículo (figura 3).

Por fim, após 21 dias não foram encontrados edema, mionecrose e infiltrado inflamatório, entretanto foi evidenciada a presença de fibras novas imaturas em grau discreto, em todos os grupos avaliados (figura 3).

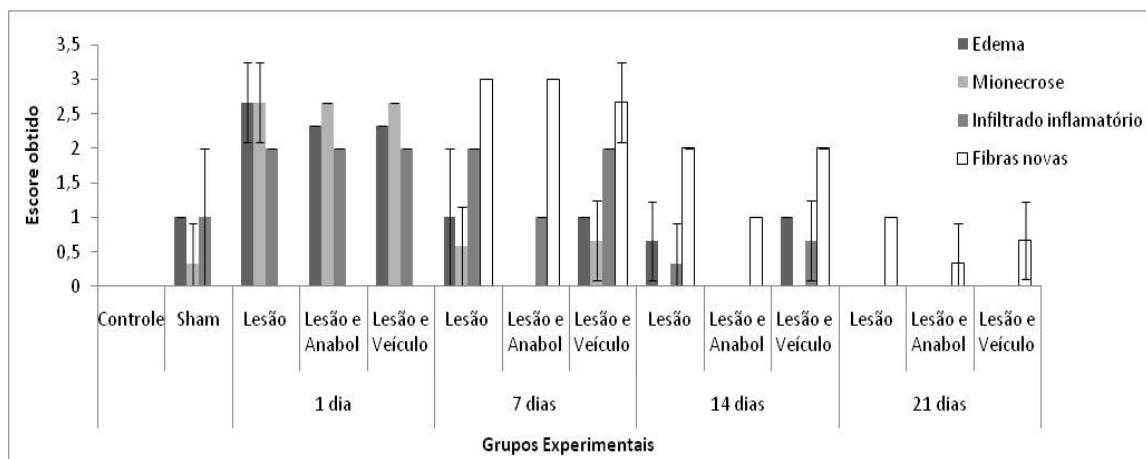


Figura 3: Análise semi-quantitativa pela graduação dos componentes teciduais nos diferentes grupos experimentais. Grau 0: ausente; Grau 1: discreto; Grau 2: moderado; Grau 3: intenso (Walker 2006) ³⁴.

Análise da expressão de marcadores miogênicos

Os resultados obtidos para a expressão de RNAm de MyoD evidenciaram que após 1 dia do início do protocolo experimental, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais.

Já no período de 7 dias, houve um aumento significativo do RNAm de MyoD no grupo criolesionado e tratado com anabolizante quando comparado aos demais grupos experimentais deste período, ou seja, controle, sem criolesão e tratado com anabolizante, sem criolesão e que recebeu somente o veículo e com criolesão e que recebeu apenas o veículo. Este aumento também foi significativo com relação aos demais períodos avaliados (figura 4).

Nos grupos 14 e 21 dias não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de RNAm de MyoD entre os diferentes grupos experimentais de cada período, porém podemos verificar uma diferença estatística significativa em comparação com os grupos do período de 7 dias e. Além disso, vale ressaltar que nestes períodos os valores de expressão de RNAm de MyoD voltaram a ser semelhantes aos encontrados nos grupos 1 dia, não sendo evidenciadas diferenças significativas (figura 4).

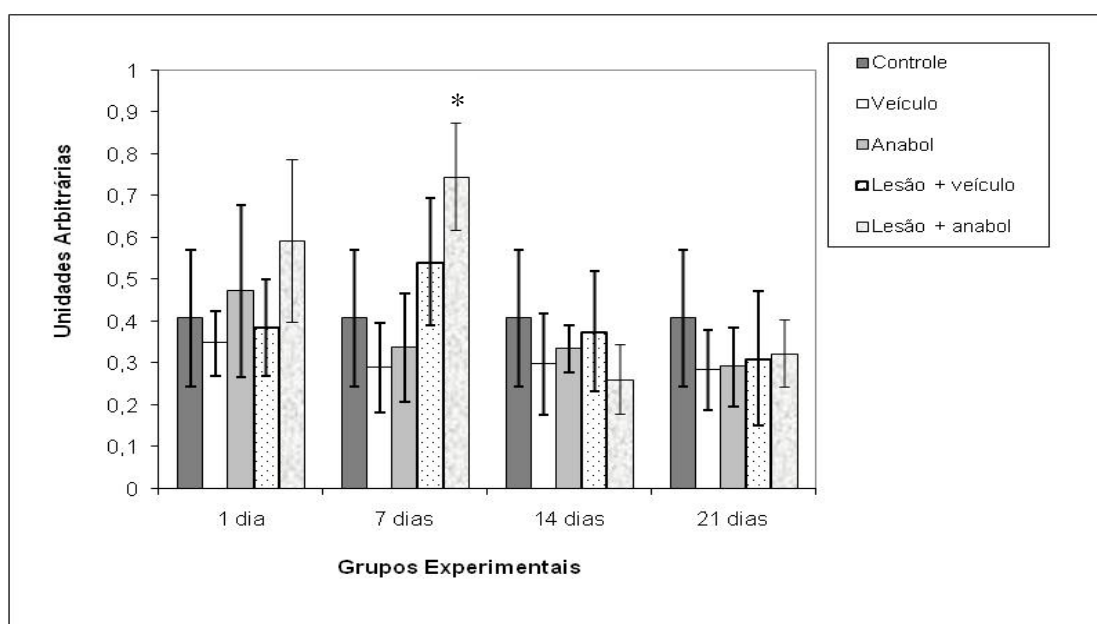


Figura 4: Análise da expressão de RNAm de MyoD nos grupos experimentais estudados (*p<0,05).

Com relação à expressão de RNAm de miogenina não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos 1, 7 e 14 dias, porém no período após 21 dias foi possível verificar um aumento na expressão de RNAm de miogenina no grupo criolesionado tratado com anabolizante em comparação aos demais grupos deste mesmo período, como demonstrado na (figura 5).

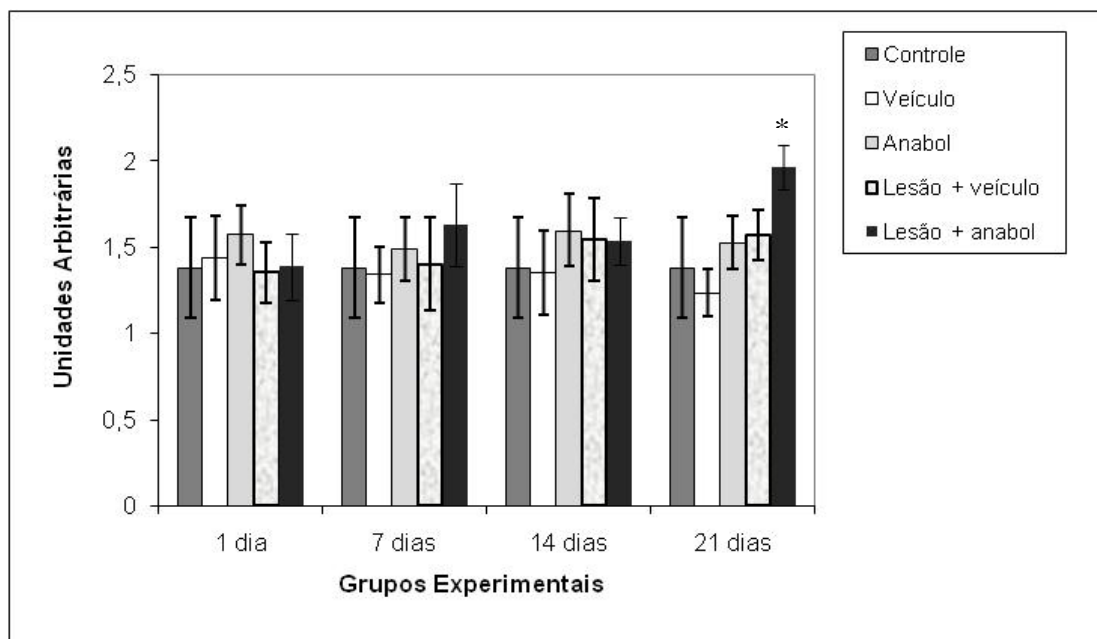


Figura 5: Análise da expressão de RNAm de Miogenina nos grupos experimentais estudados (* $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O tecido muscular pode sofrer lesão frente a diferentes estímulos, porém responde de forma semelhante por meio de um processo de reparo altamente organizado que visa restabelecer morfofuncionalmente ao tecido ^{1,4,12}. Vários recursos e modalidades terapêuticas são empregados para tentar proporcionar um processo de reparo muscular de melhor qualidade e menor duração ^{15,16}. Com este objetivo o uso do anabolizante Decanoato de Nandrolona por atletas e não atletas tem se tornado cada vez mais freqüente uma vez que seu uso está diretamente relacionado ao desempenho muscular por meio do aumento de força e o tamanho do músculo.

Os resultados do presente estudo permitiram verificar que este anabolizante parece ter contribuído de maneira favorável ao processo de reparo uma vez que após 7 dias provocou um aumento significativo na expressão do fator miogênico MyoD em comparação aos grupos que não receberam o anabolizante uma vez que este fator é expresso em fases iniciais após à lesão muscular e está envolvido especialmente com a ativação das células satélites ^{17,18}. Além disso, também foi possível evidenciar que o tratamento com decanoato de nandrolona induziu um aumento de RNAm de

miogenina após 21 dias da lesão sendo este fator miogênico diretamente relacionado a diferenciação das células musculares ^{20,21}.

Souza et al ²², verificaram que o uso deste mesmo anabolizante acelerou a regeneração muscular e aumentou a expressão de RNAm de MyoD em ratos entre 7 a 14 dias após uma mionecrose causada pelo do veneno de Jararacussu. Já o estudo realizado por Jin et al ²³ evidenciou que após a mionecrose provocada por administração de anestésico (cloridrato de bupivacaína), em ratos distróficos, níveis detectáveis de MyoD apareceram após 18 horas e alcançaram seu pico após 48 horas enquanto a miogenina permaneceu inalterada nas primeiras 24 horas e atingiu seu pico de expressão após 72 horas, confirmando a expressão de MyoD nas fases iniciais e da miogenina nas fases mais tardias do processo de reparo muscular. Contudo, no estudo citado a técnica de análise foi a imunohistoquímica.

White et al 2009 ²⁴, também utilizaram o modelo de lesão muscular induzida por bupivacaína e analisaram a expressão de IGF-1, fator de crescimento que atua estimulando e regulando o crescimento de fibras novas imaturas, em grupos experimentais tratados com decanoato de nandrolona após 5, 14 e 42 dias. Estes autores demonstraram que após 5 dias de tratamento com o anabolizante houve um aumento na expressão de RNAm de IGF-1 estimulando desta forma o processo de reparo .

No que diz respeito à análise morfológica dos músculos após a criolesão no presente estudo foi verificado que no grupo 1 dia, o músculo esquelético apresentou, edema, infiltrado inflamatório e mionecrose. Após 7 dias não foram detectados edema e mionecrose e após 14 dias, edema e infiltrado inflamatório somente no grupo tratado com anabolizante. Além disso, os grupos tratados com anabolizante evidenciaram um aumento mais precoce de fibras novas e imaturas. Assim é possível verificar que o uso do anabolizante decanoato de nandrolona parece ter acelerado a resolução do processo inflamatório e favorecido o reparo do tecido muscular.

Os resultados de análise morfológica estão de acordo com os descritos por Myabara et al ¹³, que identificaram regeneração completa após 3 semanas de injúria e com Pavesi et al ²⁵ que realizaram o mesmo protocolo de criolesão em ratos, para analisar os aspectos morfológicos além da distribuição colágeno tipo IV e metaloproteases 2 e 9 nas diferentes etapas do remodelamento

muscular. Neste último estudo foi evidenciada a regeneração do músculo esquelético após o período de 21 dias e, além disso, somente após este período o colágeno IV alcançou a organização de forma semelhante ao músculo não agredido, tanto no endomísio quanto no perimísio.

Em adição, estes resultados também estão de acordo com Baptista et al ²⁶ que utilizaram o protocolo experimental de criolesão, porém, realizaram o tratamento com laser de baixa potência e verificaram que este recurso proporcionou um aumento de colágeno tipo IV nos 7 primeiros dias, sem interferir na duração do processo de reparo, sendo a regeneração muscular evidenciada após 21 dias, tanto no grupo tratado quanto no submetido apenas a lesão.

Por fim, com relação aos pesos dos animais foi observado um aumento significativo do peso final apenas nos animais do grupo 14 dias, os resultados corroboram com os observados por, White et al 2009 ²⁴, que também observaram um aumento do peso no mesmo período experimental com o uso do anabolizante, no entanto a dose da utilização do anabolizante foi de 6mg/kg a cada 7 dias de tratamento, as doses suprafisiológicas dos esteróides anabolizantes resultam em uma alteração do músculo esquelético. O uso destes esteróides seja por atletas ou não resultam em um aumento do desempenho aumentando assim a força muscular ^{24,27}.

CONCLUSÃO

Desta forma, com base nos achados presentes é possível concluir que o anabolizante Decanoato de Nandrolona (Deca-Durabolin), acelerou o processo de regeneração tecidual em ratos após criolesão modulando a expressão de fatores miogênicos e as fases de reparo, entretanto existe a necessidade da realização de estudos posteriores para o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20: 1692–708.

- 2- Charge, Sophie B. P., and Michael A. Rudnicki. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol* 2004; 84: 209–238.
- 3- Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology. Basic and clinical* 1994; p 97-118.
- 4- McClung JM, Meh 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.
- 5- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91:534–551.
- 6- Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OHP, Perez SEA, Carvalho HF, Araujo HSS. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effect of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol* 2008.
- 7- Dominov JA, Dunn JJ, Miller JB. Bcl-2 Expression Identifies an Early Stage of Myogenesis and Promotes Clonal Expansion of Muscle Cells. *J Cell Biol* 1998; 142(2):537-544.
- 8- Cabane C, Englaro W, Yeon K, Ragno M, Dérijard B. Regulation of c2 c12 myogenic terminal differentiation by mkk3/ p 38 alpha pathway, *American journal physiol cell* 2003, 284: 658-666.
- 9- Tannu NS, Rao VK, Chaudhary RM, Giorgianni F, Saeed AE, Gao Y, Raghov R. Comparative Proteomes of the Proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Mol Cell Proteomics* 3 2004; 1065-1082
- 10- Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zang W, Kang JS. Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J. Cell Science* 2005; 118:2355-2362.
- 11-McClung JM, Meh 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: 1543–155.
- 12-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. *JBC* 2007; 1-16.
- 13-Miyabara EH, Aoki MS, Moriscot AS. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Braz J Med Biol Res.* 2005b; 38(4):559-63.
- 14-Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjær M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, and Takala TES. Turnover of basement membrane type IV collagen in exercise-induced skeletal muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 1292– 1300.
- 15-Durigan JLQ, Messa SP, Delfino T, Salvini TF. Effects of alternagin-c from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. *Toxicon*, 2008; 52: 687-694.
- 16-Walker RA. Quantification of immunohistochemistry-issue concerning methods, utility and semiquantitative assessment 1. *Histochemistry* 2006; 49:406-10.
- 17-Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int Orthop* 1987; 11:157–162.
- 18-Miles JW, Grana WG, Egle D, Min KW, Chitwood J. The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg* 1992; 74:411–422.
- 19- Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min KW, Tomasek J The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sport Med* 1995; 23:227–232.
- 20-Mottram DR, George AJ Anabolic steroids. *Baillière's best practice and research. Bailliere Clin Endocrinol Meth* 2000;14: 55–69.
- 21-Zammit P S, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp J R. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 2004; 166, 347-357.
- 22-Souza RWA, Gonçalves W, Cavalcante, WLG, Silva MDPS, Gallacci M. Nandrolona stimulates MyoD expression during muscle regeneration in the condition of myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* venom poisoning. Department of pharmacology institute of biosciences São Paulo, Brazil *Journal of toxicology and environmental health* 2010; 73: 934-943.

- 23-Jin Y, Murakami M, Saito Y, Goto Y, Koishi K, Nonaka Y. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, mdx and dy, during regeneration. *Acta Neuropathol*, 2000; 99 : 619–627.
- 24-White JP, Baltgalvis KA, Sato S, Wilson LB, Carson JA. Effect of mandrolone decanoate administration on recovery from bupivacaine-induced muscle injury. *Interative muscle biology laboratory, exercise science department, university of Carolina; J Appl physio* 2009.;107: 1420-1430.
- 25-Pavesi VCS, Mesquita RA, Mesquita DS, Baptista J, Martins MD. Remodelamento do músculo esquelético: Papel da matriz extracelular. *Terapia Manual*, 2009 ; 8: 68-75.
- 26-Baptista J, Martins M, Pavesi V, Bussadori S, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling following injury in rats. *Photomed Laser Surgery* 2010; PMID: 20701543.
- 27-Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration . *J Appl Physiol* 2003; (2): 771-80.

ESTUDO 2: Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional (Publicado pela Revista Fisioterapia em Movimento, 2009)

ISSN 0103-5150
Fisioter. Mov., Curitiba, v. 22, n. 2, p. 211-220, abr./jun. 2009
Licenciado sob uma Licença Creative Commons



UMA REVISÃO SOBRE A PLASTICIDADE DO MÚSCULO ESQUELÉTICO: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional

Review on the plasticity of skeletal muscle: expression of myosin heavy chain isoforms and functional correlation

Roberto Farina Piovesan^a, Manoela Domingues Martins^b, Kristianne Porta Santos Fernandes^c, Sandra Kalil Bussadori^d, Heloísa Sobreiro Selistre-de-Araújo^e, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari^f

¹ Aluno de mestrado em Ciências da reabilitação de Universidade Nove de julho - UNINOVE;

² Docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE;

³ Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

Endereço para contato: *Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari (✉), Rua Vilela, 239, Tatuapé, CEP 03068-000, São Paulo-SP, Brasil, 11-9919-2988. E-mail: raquel.mesquita@gmail.com

TÍTULO CONDENSADO: Plasticidade do músculo esquelético.

Resumo

O músculo esquelético é um tecido dinâmico com a habilidade intrínseca de se adaptar frente a estímulos ambientais como resultado de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão gênica sendo esta capacidade definida como plasticidade. Este tecido é composto por populações de fibras rápidas e lentas que diferem fenotipicamente por expressarem diferentes isoformas de cadeias pesadas de miosina (CPM). Miosinas constituem uma família de proteínas chamadas “motores moleculares” com atividade ATPásica conhecidas por seu importante papel no processo de contração muscular. O objetivo do presente estudo foi fazer um levantamento, por meio de dados expostos na literatura, da relação existente entre a expressão de diferentes CPM no processo de remodelamento muscular em condições fisiológicas e patológicas. O resultado desta revisão permitiu verificar que a fibra muscular pode alterar suas características contráteis por meio de mudanças nas quantidades das CPM. A velocidade de encurtamento do músculo esquelético varia de acordo com a isoforma de CPM que possui, conferindo assim ao tecido muscular a capacidade de adaptação frente a estímulos fisiológicos e patológicos. Dessa forma, a fibra muscular pode alterar suas propriedades contráteis por meio de mudanças nas quantidades de isoformas de CPM que a constitui.

Palavras-chave: músculo esquelético, cadeia pesada de miosina, isoformas, tipo de fibra.

Abstract

Skeletal muscle is a dynamic tissue with the intrinsic ability to adapt to endogenous stimuli and environmental signals such as exercise, hormonal changes, and electrical stimulation as the result of qualitative and quantitative changes in gene expression. This tissue consists of populations of slow and fast fiber type which differ phenotypically due to the expression of different subsets of myosin isoforms. Myosins comprise a family of ATP-dependent motor proteins and are best known for their role in muscle contraction. The aim of present study was to elaborate a literature review about muscle remodeling, especially myosin heavy chain (MHC) expression, during tissue remodeling in both physiological and pathological conditions. The review's results allowed to verify that velocity of skeletal muscle shortening depends on the isoforms of myosin heavy chain (MHC), conferring on muscles the remarkable ability to adapt their performance to the physiological and pathological requirements. Muscle fibers can alter its contractile properties by changing the absolute amounts of MHC isoforms.

Key-words: skeletal muscle, myosin heavy chain, isoforms, fiber type.

Introdução

Os músculos esqueléticos são tecidos dinâmicos que podem alterar suas características fenotípicas, proporcionando uma melhor adaptação funcional frente a estímulos variados ^{1, 2, 3}. A habilidade de adaptação do tecido muscular durante o crescimento pós-natal e o exercício é dependente de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão gênica induzida pelos diversos estímulos e essa adaptação envolve seletivamente a indução ou repressão da expressão de subconjuntos de genes ^{4, 5}. Estímulos mecânicos influenciam a expressão gênica no músculo e em outros tipos celulares incluindo fibroblastos e osteoblastos. A adaptação com relação a massa muscular é regulada tanto de forma local como sistêmica, entretanto, quando o músculo é exercitado, somente ele se torna hipertrófico e não todos os músculos do corpo ⁵.

Dentre os importantes fatores determinantes das características fenotípicas musculares se encontram o tipo de inervação, atuação de hormônios, atividade contrátil ^{5, 6, 7} e condição de alongamento ^{8, 9, 10, 11}.

Com o avanço cada vez maior das técnicas e conhecimentos nas áreas de biologia celular e tecidual, genética e saúde, grandes benefícios e facilidades são proporcionados ao estudo das adaptações e alterações musculares frente ao treinamento físico, particularmente em relação à expressão de proteínas musculares, como a miosina, envolvidas na contração muscular e que garantem a especificidade deste processo. Desta forma, a proposta do presente estudo foi a fazer uma revisão da literatura sobre a estrutura e plasticidade muscular de forma a elucidar as alterações e adaptações deste tecido frente a vários estímulos patológicos e/ou fisiológicos e, em especial, a expressão de cadeias pesadas de miosina (CPM) nestes diferentes processos de remodelamento muscular.

Metodologia

Esta revisão foi realizada por meio de levantamento de dados descritos na literatura sendo consultados os bancos de dados internacionais “Pubmed” e “Highwire Press” e os bancos de dados nacionais Scielo e Lilacs, no período de janeiro a abril de 2008, incluindo num total de 49 documentos incluindo artigos científicos, livros e teses. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram músculo esquelético, cadeia pesada de miosina, isoformas e tipo de fibra para as pesquisas realizadas nos bancos de dados nacionais e suas versões na língua inglesa, “skeletal muscle”, “myosin heavy chain”, “isoforms” e “fiber type” para a busca em bancos de dados internacionais (Pubmed e Highwire Press), não havendo critérios para exclusão quanto ao ano de publicação e os idiomas dos artigos.

Resultado

Após a realização do levantamento dos dados descritos na literatura sobre a plasticidade muscular e, mais especificamente, sobre as alterações nas quantidades e tipos de isoformas de CPM frente aos vários estímulos aos quais o tecido muscular pode ser submetido, os resultados foram organizados em tópicos de forma a facilitar o entendimento, conforme se segue.

O músculo esquelético e sua composição quanto ao tipo de fibra

O movimento é a propriedade básica da vida e ele só é conseguido graças a motores moleculares que convertem energia química em energia mecânica gerando a força para o movimento ¹².

As fibras dos músculos esqueléticos contêm miofibrilas, estruturas multinucleadas resultantes da fusão de vários mioblastos, que são formadas de filamentos proteicos arranjados em unidades chamadas sarcômeros. Os sarcômeros contêm principalmente actina e miosina, que são as principais proteínas contráteis. O arranjo dos filamentos de actina e miosina é responsável pela aparência estriada transversal do músculo ^{13, 14}.

Os músculos esqueléticos adultos são compostos de vários tipos de fibras, sendo caracterizados por diferenças quanto ao tipo de contração e classificados em dois grandes grupos, lento ou de contração lenta (tipo I) e rápido ou de contração rápida (tipo II) ^{15,16}. Porém existem ainda subtipos de

fibras rápidas que são as seguintes IIa, IIb e IId(x) sendo a IIb a mais rápida. A fibra IIa é uma fibra rápida intermediária, possuindo potencial moderadamente desenvolvido para geração de força, tanto de maneira aeróbica quanto anaeróbica, sendo portanto rápida porém com certa resistência à fadiga. A fibra IIb possui maior potencial anaeróbico, sendo portanto mais rápida, porém mais fatigável que a IIa.

A composição do músculo em relação aos diferentes tipos de fibras depende da função do músculo. Músculos posturais, ou seja, os músculos da estática como por exemplo o músculo sóleos, possuem uma maior proporção de fibras de contração lenta (tipo I), oxidativas e resistentes a fadiga que são adaptadas para atividades pouco repetitivas ou posturais, enquanto os músculos envolvidos em atividades rápidas e que exigem força, que são chamados músculos da dinâmica como por exemplo bíceps braquial, possuem maior quantidade de fibras de contração rápida (tipo II) altamente fadigáveis ^{5, 17}.

A classificação de tipos de fibras musculares pode ser feita utilizando-se diferentes métodos. Uma das classificações se baseia na atividade ATPásica da miosina e as diferenças nessa atividade dependem do tipo de CPM que está constituindo a fibra muscular visto que a propriedade contrátil de cada tipo de fibra é determinada, em parte, pelo tipo e quantidade de CPM que a fibra contém ^{15, 18}.

Outra maneira de classificar as fibras musculares é através da identificação de diferenças em propriedades metabólicas da fibra muscular histoquimicamente e, para isso, estudam-se as enzimas chaves dos metabolismos aeróbico e anaeróbico. De acordo com essas diferenças metabólicas, é possível chegar a seguinte classificação: fibras rápidas glicolíticas (FG), fibras rápidas oxidativas (FOG) e fibras lentas oxidativas (SO) ¹⁹.

A miosina e o processo de contração muscular

O aparato contrátil é organizado em uma unidade funcional, o sarcômero, que consiste da combinação de filamentos finos e grossos. O filamento fino, que está ancorado pelo citoesqueleto à linha Z, consiste da polimerização de hélices de actina, com moléculas de tropomiosina ancoradas. Uma molécula de

tropomiosina é associada com sete moléculas de actina e um complexo de troponina é associado com cada tropomiosina. A troponina consiste de 3 subunidades: troponina T, que representa o sítio de ligação a tropomiosina, troponina C, que representa o sítio de ligação ao cálcio e troponina I, que é a subunidade que inibe a formação de pontes cruzadas entre a actina e a miosina quando a concentração de cálcio no meio intracelular está abaixo do limiar de ativação²⁰. O filamento grosso consiste de dímeros de CPM.

A contração esquelética e cardíaca resulta da interação entre a actina e a miosina (ponte cruzada), de forma cíclica, na qual a energia química obtida a partir da hidrólise de ATP é convertida em trabalho mecânico, força e encurtamento. Os mecanismos da atividade ATPásica da miosina e actomiosina têm sido extensivamente estudados *in vitro* e *in situ* em fibras musculares esqueléticas. Essencialmente, o ciclo ponte-cruzada é uma reação enzimática, segundo descrito por Huxley, em 1953. Esse processo pode ser simplificado e representado como dois estágios. Estágio de geração de força no qual as pontes cruzadas estão fortemente formadas e estágio de não geração de força no qual as pontes de miosina estão destacadas da actina^{21, 22, 23}.

O aumento da força isométrica com o aumento de cálcio mioplasmático pode ser explicado pelo recrutamento de pontes cruzadas no estágio de geração de força requerendo a hidrólise de ATP²².

Numerosos tipos de miosina, constituindo 18 classes distintas, foram descritos. Nas células musculares estriadas a miosina é a proteína mais abundante representando aproximadamente 25% do conteúdo total protéico e, nessas células, a miosina presente é a do subgrupo chamado classe II ou miosina convencional, que é uma miosina sarcomérica, estando associada ao processo de contração muscular. Assim, a miosina das células musculares é considerada um “motor molecular” devido a capacidade de converter a energia química liberada pela hidrólise do ATP em força mecânica^{18, 24} e sendo portanto, extremamente importante na contração muscular.

A miosina de classe II, é um heterohexâmero contendo 2 cadeias pesadas (CPM) de aproximadamente 200kDa e quatro cadeias leves (CLM) (duas cadeias essenciais de miosina leve e duas cadeias regulatórias de miosina leve) de aproximadamente 20 kDa, as quais possuem importante papel

de modulação durante a contração muscular (figura 1) ^{17, 23, 25}. A CPM é responsável pela atividade ATPásica (geração de energia) para contração muscular enquanto que, as CLMs desempenham funções regulatórias. A expressão de genes, tanto para a miosina pesada quanto para a leve, é controlada por muitos fatores incluindo descargas do motoneurônio, condições de sobrecarga e hormônios ²⁶.

Existem múltiplas isoformas para as cadeias pesada e leve de miosina. Isoformas são proteínas muito similares, codificadas por genes distintos, capazes de desempenharem as mesmas funções das originais (contração muscular), mas pequenas diferenças destas isoformas, ou seja, nas seqüências de aminoácidos que as constituem, podem causar diferentes propriedades estruturais e funcionais como, por exemplo, na velocidade e geração de força durante a contração muscular ²⁶.

Na contração, durante o ciclo de ATPase, o domínio motor da miosina (ou ponte cruzada) sofre uma série de alterações conformacionais resultando na translocação da miosina com relação ao filamento de actina. A seqüência dos eventos moleculares da ligação cruzada entre actina e miosina parece ser similar para todas as isoformas de miosinas intensamente estudadas ²⁷.

Miosinas são tipicamente constituídas de três domínios funcionais (1) domínio motor: interage com a actina e liga o ATP; (2) domínio pescoço que liga cadeias leves ou calmodulina e (3) domínio da cauda que serve como âncora e posiciona o domínio motor para que ele consiga interagir com a actina ²⁸.

A região N-terminal da molécula de cada CPM consiste em uma cabeça globular conhecida como região S1, que contém o sítio de ligação ao ATP e, portanto, é responsável pela atividade ATPásica da molécula de miosina ^{12, 18, 26, 29}. A cabeça globular (S1) também contém a superfície para ligação à actina e pode ser dividida em 3 partes pela digestão com papaína: domínios de 25 kDa, 50 kDa e 20 kDa ²⁶.

Já está estabelecido que as propriedades mecânicas essenciais de contração muscular, isto é, máxima velocidade de contração e força gerada por ponte cruzada, são propriedades relacionadas ao tipo de CPM no tecido muscular ²⁷ que depende do estímulo gerado, por tanto quando o tipo de atividade muscular muda, a proporção de isoformas particulares de CPM

também muda ¹, porém, combinações diferentes de cadeias pesadas e leves podem aparecer na mesma fibra muscular e até no mesmo filamento de miosina ²⁵.

O músculo esquelético expressa CPM tipo I e proporções variadas das isoformas rápidas IIa, IIx e IIb ^{16, 27}. Músculos de humanos e vários mamíferos parecem não expressar a isoforma de CPMIIb em condições normais. Neste contexto, fibras previamente classificadas como IIb nos humanos foram mais recentemente classificadas como IId, baseado em sua constituição de CPM ³⁰. A isoforma de CPM IId(x) foi descoberta em músculos rápidos de ratos, graças ao avanço das técnicas de separação por eletroforese de isoformas de CPM de fibras individuais ^{31, 32}. Há grande similaridade entre a atividade ATPásica da CPMIIb e IId(x) e, assim, em muitos estudos, fibras IId podem ter sido classificadas erroneamente como IIb.

A velocidade máxima de encurtamento ($V_{m\acute{a}x}$) da fibra muscular é menor nas fibras do tipo I quando comparada às fibras rápidas e dentro da população de fibras rápidas o tipo IIb apresenta maior $V_{m\acute{a}x}$ quando comparada com os outros tipos, IId e IIa que possuem valores de $V_{m\acute{a}x}$ similares, porém mais baixos que o tipo IIb ^{1, 30, 33}. Dessa forma, o músculo tem a capacidade de adaptação frente às necessidades impostas pela modulação da expressão gênica destas isoformas ¹.

Os resultados encontrados por Delp & Duan em 1996 ³⁴ demonstraram que fibras rápidas do tipo IId/x constituem uma significativa proporção da massa muscular do rato adulto e representam um tipo intermediário aos tipos de fibras IIa e IIb no que diz respeito ao tamanho da fibra e ao potencial oxidativo.

Existe um polimorfismo de expressão de isoformas de CPM em miofibrilas individuais, ou seja, fibras tanto em desenvolvimento quanto em músculos esqueléticos adultos apresentam-se como híbridas, co-expressando mais do que um tipo de isoforma de CPM em diferentes proporções ³⁵. Este polimorfismo varia de acordo com o tipo de músculo como, por exemplo, no músculo plantar existe grande polimorfismo, enquanto que no músculo sóleos de rato adulto pode ser encontrada uma população aproximadamente de 70% de fibras que expressam somente um tipo de isoforma de CPM, a CPM lenta do tipo I ³⁶.

Condições que interferem na expressão de CPM

No músculo esquelético de adulto, a expressão de diferentes isoformas de CPM é determinada por fatores como a atividade neural, influência hormonal e fatores mecânicos, como por exemplo, à sobrecarga funcional (exercício, alongamento, estimulação neuromuscular, outros) e decréscimo da atividade muscular (imobilização, situações de ausência de gravidade, outros) 6, 37, 38.

A atividade neuromuscular é importante para o estabelecimento dos tipos de fibras musculares específicas durante o desenvolvimento pós-natal e para subsequente manutenção das propriedades desses fenótipos. Na ausência de inervação, músculos lentos se tornam rápidos e músculos rápidos se tornam lentos³⁰. A estimulação elétrica crônica de baixa frequência é um método já muito bem estabelecido e usado para induzir mudanças específicas nas propriedades musculares. Esta estimulação, ao contrário do exercício, se restringe somente ao músculo estimulado e, portanto, é menos influenciada por mudanças que ocorrem no corpo durante o treinamento. Este modelo de estimulação crônica permite o estudo tanto das alterações funcionais quanto das alterações que ocorrem em nível molecular e assim oferece a possibilidade de investigar sua influência sobre a expressão de genes específicos¹⁹. Salmons & Vrbová³⁹ utilizaram este modelo de estimulação elétrica crônica nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e tibial anterior de coelho e no músculo flexor longo dos dedos (FDL) de gato a 10 Hz e verificou que houve conversão desses músculos, que eram rápidos, para lentos.

Outro exemplo de plasticidade muscular com relação à expressão de CPMs de adaptação foi demonstrado por Buller et al.⁴⁰ que verificaram que quando um músculo lento como o sóleo é reinervado por fibras nervosas, que normalmente inervam músculos rápidos, a sua velocidade de contração aumenta. Quando feito o inverso, ou seja, músculos rápidos reinervados com fibras nervosas de sóleo (lentas), esses passam a ter menor velocidade de contração⁴¹.

Em 1998, Jaschinski et al.⁴² verificaram que músculos classificados como rápidos podem ser transformados em músculos de contração lenta através de estimulação crônica de baixa frequência. Este processo engloba a transição de fibras rápidas para lentas, com alterações seqüenciais na

composição de CPM. Em seu estudo, encontrou que nos músculos dos membros inferiores de coelhos, no qual a CPM IId é a isoforma rápida predominante, as transições obedeceram à seguinte seqüência: CPM IId(X) → CPM IIa → CPM I, sendo essa última isoforma, que corresponde à mais lenta isoforma, predominante em músculos estimulados por sessenta dias. Portanto está claro que a estimulação crônica de baixa freqüência induz, nos músculos rápidos de rato, pronunciadas alterações na expressão de isoformas de CPM, porém parece que este efeito permanece restrito a expressão das miosinas rápidas.

Um consistente achado do uso da estimulação crônica de baixa freqüência é o aumento da resistência à fadiga que pode estar associada com o aumento da capilarização e marcada elevação na capacidade aeróbica-oxidativa induzida por este tipo de estimulação. O aumento da densidade capilar, isto é, número de capilares por área é uma combinação de aumento no número de capilares e uma redução no diâmetro da fibra-muscular, e estas duas situações ocorrem após estimulação crônica ¹⁹.

De forma similar, a estimulação elétrica crônica de baixa freqüência, o estiramento e a sobrecarga mecânica podem causar transições nas isoformas de CPM. O estiramento conseguido através de uma imobilização de músculos rápidos em posição de alongamento tem como resultado um aumento na proporção de fibras lentas e transições na expressão de isoformas de CPM rápidas para lentas ^{4, 9, 3, 43}.

Mudanças na quantidade de isoformas de CPM não são sempre acompanhadas por mudanças nos níveis de seus RNAm, o que sugere vários mecanismos de controle para as isoformas de CPM ³³.

Um dos hormônios que interfere na expressão gênica de miosina é o hormônio da tireóide, mais especificamente o T3 (triiodotironina) que modula as alterações na expressão de CPM de miosina esquelética induzidas por atividade ou inatividade. Há aproximadamente duas décadas, tornou-se aparente que esse hormônio tiroideano T3 exerce um efeito profundo na plasticidade do músculo estriado devido à sua grande influência na expressão de família de genes de CPM das proteínas motoras ^{36, 44}. A exemplo disso, no miocárdio a expressão de CPM α é induzida pelo

hormônio da tireóide enquanto que a expressão de CPM β é reprimida por este hormônio ⁴⁶.

A expressão gênica protéica específica para o tipo de fibra não é restrita somente para as isoformas de miosina existindo, também, para muitas outras proteínas musculares como, por exemplo, isoformas para as cadeias leves essenciais e regulatórias, para as três subunidades de troponina, tropomiosina, várias proteínas reguladoras de cálcio, entre outras ^{25, 47}.

A atividade contrátil é um poderoso e rápido regulador da expressão de isoformas de CPM. Em roedores, aproximadamente dois dias de estimulação motora nervosa de baixa frequência induziu a repressão de RNAm de CPM IIb seguido por um pequeno aumento nos níveis de RNAm de CPM IIa ⁴⁸. O'Neill et al. ⁴⁸ estudaram o efeito do treinamento através do exercício na regulação da expressão de isoformas de CPM no músculo esquelético humano e observaram que as concentrações de RNAm das isoformas de CPM não se alteravam significativamente após três horas de única sessão de treinamento em bicicleta ergométrica, porém, após o término de um período de sete dias de treinamento, houve um significativo decréscimo no RNAm de CPM IIx. Esses achados sugerem que a indução de alguns genes de músculos esqueléticos é resultado de um efeito cumulativo da atividade contrátil. Em adição a isso, também foi observado que indivíduos que já praticavam atividade anteriormente, apresentavam uma resposta mais acentuada ao treinamento proposto.

O treinamento de “endurance” (resistência) causa mudanças na expressão de miosina de músculos esqueléticos levando a uma redução na quantidade do tipo de miosina rápida, ou tipo IIb, e aumento do tipo de miosina lenta ⁶.

O modelo de hipertrofia compensatória, conseguido em experimentos animais através da retirada do músculo sinergista (músculo que auxilia o músculo principal da função avaliada) ao que está sendo estudado, também é muito utilizado para estudar o efeito da sobrecarga funcional sobre a expressão gênica e síntese protéica ⁷.

Um dos modelos utilizados para verificar a adaptação muscular frente à redução de atividade é submeter o músculo à ausência de gravidade utilizando

experimentos realizados no espaço. Esta situação resulta em dramáticas adaptações no sistema muscular com significativa perda de massa muscular com correspondente redução na área de secção transversa. Depois de 14 dias no espaço, a porcentagem de CPMIIa diminuiu bastante e as porcentagens de IIb e IId foram significativamente maiores, sendo que a CPM IId se tornou a isoforma predominante em ratos após 14 dias no espaço. Estes dados mostram que a ausência de gravidade provoca transformações nos músculos de forma que fibras rápidas IIa se tornam mais rápidas ainda ⁴⁷.

As mudanças nas isoformas de CPM tendem a seguir uma seqüência geral de transições reversíveis, quer seja de rápido para lento ou de lento para rápido: CPMI \leftrightarrow CPMIIa \leftrightarrow CPMIId(x) \leftrightarrow CPMIIb ³⁰.

Em se tratando de expressão de miosina, os estudos *in vitro* têm ganhado cada vez mais atenção. Sakiyama et al. ¹¹ e Kurokama et al. ⁴⁹ utilizaram o alongamento mecânico em mioblastos da linhagem C2C12 e verificaram influência direta sobre a expressão de isoformas de miosina, encontrando valores maiores tanto para a CPM IIa quanto para IId, após a aplicação do alongamento. Assim, verificaram que as células miogênicas respondem a estímulos e alterações no meio ambiente.

Referências Bibliográficas do estudo 2

1. Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, Pavone FS, Bottinelli R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. PNAS 2006; 103(1): 87–92;
2. Goldspink G. Gene expression in muscle in response to exercise. J Muscle Res Cell Motil 2003; 24: 121–126.
3. Mckoy G, Hou Y, Yang SY, Vega Avelaira D, Degens H, Goldspink G, Coulton GR. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. J Appl Physiol 2005; 98: 2337–2343.
4. Goldspink G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fiber mass and phenotype. Adv Exerc Sports Physiol 1999; 5:27-39.

5. Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology* 2005; 20: 232–238.
6. Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC, D'Albis A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* 1996; 81(6):2658-2665.
7. Lieber RL. *Skeletal Muscle Structure and Function – Implications for Rehabilitation and Sports Medicine*, 1992.
8. Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J* 1991; 5:3064-3070.
9. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach, GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol* 1992; 262:356-363.
10. Staron RS, Johnson P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp Biochem* 1993; 204:569-573.
11. Sakiyama K, Abe S, Tamatsu Y, Ide Y. Effects of stretching stress on the muscle contraction proteins of skeletal muscle myoblasts. *Biomed Res.* 2005; 26(2):61-8.
12. Goldspink G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1998; 120:5-15.
13. Jansen KM, Pavlath GK. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *The Journal of Cell Biology* 2006, 174(3):403–413.
14. Hooper SL, Thuma JB. *Invertebrate Muscles: Muscle Specific Genes and Proteins*. *Physiol Rev* 2005; 85: 1001–1060.
15. Lefeuvre B, Crossin F, Fontaine-Perus J, Bandman E, Gardahaut MF. Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. *Mech Dev* 1996; 58(1-2):115-127.
16. Baldwin M, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90:345-357.
17. Libera LD, Carpena E. Myosin heavy and light chains and myosin light chain kinase in skeletal and smooth muscle of some wild avian species. *Comp Biochem Physiol* 1997; 116(B):45-50.
18. Liang CS, Kobiyama A, Shimizu A, Sasaki T. Fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of medaka *Oryzias latipes* enrolled in temperature adaptation. *Physiol Genomics* 2007; 29:201–214.
19. Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 120, 116-202

20. Murphy AM. Contractile protein phenotypic variation during development. *Cardiovascular Research* 1996; 31:25-33.
21. Eisenberg BR, Salmons S. The reorganization of sub cellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. *Cell Tissue Res* 1981; 220:449-471.
22. Sieck GC, Regnier M. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: Invited Review: Plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90, 1158-1164.
23. Cammarato A, Dambacher CM, Knowles AF, Kronert WA, Bodmer R, Ocorr K, Bernstein SI. Myosin Transducer Mutations Differentially Affect Motor Function, Myofibril Structure, and the Performance of Skeletal and Cardiac Muscles. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19:553–562.
24. Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE. Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 1999; 216, 312-326.
25. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 26:371-423.
26. Reggiani C, Bottinelli R, Stienen GJM. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol Sci* 2000; 15:26-33.
27. Iorga B, Adamek N, Geeves MA. The slow skeletal muscle isoform of myosin shows kinetic features common to smooth and non-muscle myosins. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(6):3559–3570.
28. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496:3-22.
29. Lutz GJ, Razzaghi S, Lieber RL. Cloning and characterization of the S1 domain of four myosin isoforms from functionally divergent fiber types in adult *Rana pipiens* skeletal muscle. *Gene* 2000; 250:97-107.
30. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and Technique* 2000; 50, 500-509.
31. Maier A, Gorza L, Schiaffino S, Pette D. A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast to slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 59-68.
32. Staron RS, Pette D. The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem J* 1987; 243:695-699.

33. Jackubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J, Matusiak A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 1999; 122: 355-362.
34. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIa, IIb/x and IIb fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 1996; 80: 261-270.
35. Di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278(4):1099-1106.
36. Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, McCue S, Baldwin KM. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:709-717.
37. Verzola RMM, Mesquita RA, Peviani S, Ramos OHP, Moriscot AS, Perez S, Selistre-de-Araújo, HS. Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39:621-627.
38. Mesquita RA, Micocci KC, Perez S, Salvini TF, Selistre-de-Araújo, HS. Remodelamento muscular induzido por treinamento: expressão de miosina em músculo esquelético de rato - uma análise qualitativa. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2004; 8:117-122.
39. Salmons S, Vrbová G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol* 1969; 201(3):535-549.
40. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Correlations between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J Physiol* 1960; 205:581-597.
41. Pette D. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Historical perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001;90:1119-1124.
42. Jaschinski F, Schuler M, Peuker H, and Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:365-370.
43. Loughna PT, Morgan MJ. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1999; 439:52-55.
44. Larsson L, Muller U, Li X, Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to β -myosin. *Acta Physiol Scand* 1995;153:109-116.

45. Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1996; 24:321-361.
46. Weiss A, Leinw LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annual Reviews Cell & Developmental Biology* 1996; 12: 417-439.
47. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos G. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 1999; 111:117-123.
48. O'Neill DS, Zheng D, Anderson WK, Dohm GL, Houmard JA. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 1999; 45:414-419.
49. Kurokawa K, Abe S, Sakiyama K, Takeda T, Ide T, Ishigami K. Effects of stretching stimulation with different rates on the expression of MyHC mRNA in mouse cultured myoblasts. *Biomed Res* 2007; 28(1): 25-31.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo podemos constatar que o tratamento com o esteróide anabolizante Decanoato de Nandrolona (DECA-DURABOLIN[®]) induziu um aumento significativo na expressão dos marcadores miogênicos relacionadas a ativação e diferenciação das células satélites, diminuindo o infiltrado inflamatório, edema e mionecrose na fase aguda e sub-aguda e acelerando o processo de reparação tecidual verificado pelo aparecimento mais precoce de fibras novas imaturas.

Neste contexto, estes dados são importantes para que estudos posteriores ofereçam melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação do Decanoato de Nandrolona durante o processo de reparo muscular.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams GR, Haddad F, and Baldwin KM. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *Journal A. Physiol* 1999; 87: 1705–1712.

2. Bahrke MS, Yesalis C. Abuse of androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:614–620.
3. Baldwin M, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90:345-357.
4. 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. *New England Journal of Medicine* 1996; 335:1–7.
5. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C. Testosterone dose–response relationships in healthy young men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 2001; 281:1172–1181.
6. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, Yarasheski KE, Sinha-Hikim I, Dzekov C, Dzekov J. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90:678–688.
7. Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC, D'Albis A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* 1996; 81(6):2658-2665.
8. Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology. Basic and clinical* 1994; p 97-118.
9. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
10. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J Physiol* 1960; 205:581-597.
11. Cabane C, Englaro W, Yeon K, Ragno M, Dérijard B. Regulation of c2c12 myogenic terminal differentiation by mkk3/ p 38 alpha pathway, *American journal physiol cell* 2003, 284: 658-666.

12. Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, McCue S, Baldwin KM. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:709-717.
13. Caiozzo VJ, Haddad F. Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1996; 24:321-361.
14. Cammarato A, Dambacher CM, Knowles AF, Kronert WA, Bodmer R, Ocorr K, Bernstein SI. Myosin Transducer Mutations Differentially Affect Motor Function, Myofibril Structure, and the Performance of Skeletal and Cardiac Muscles. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19:553–562.
15. Capitanio M, Canepari M, Cacciafesta P, Lombardi V, Cicchi R, Maffei M, Pavone FS, Bottinelli R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *PNAS* 2006; 103(1): 87–92;
16. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol* 2003; (2): 771-80.
17. Chargè SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238.
18. Charge, Sophie B P, Michael AR. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol* 2004; 84: 209–238. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model: biomechanics, physiology, and histology. *AmJ Sports Med* 1994; 22(5): 702-710.
19. Chen Y, Zajac DJ, Maclean EH. Androgen regulation of satellite cell function, *Journal of endocrinology* 2005, 186: 21-31.
20. Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1281-1292.
21. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis. *European Journal Of Cancer* 2000; 36:1621-1630.

22. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIa, IIb/x and IIb fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 1996; 80: 261-270.
23. Di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278(4):1099-1106.
24. 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. *JBC* 2007; 1-16.
25. Dominov JA, Dunn JJ, Miller JB. Bcl-2 Expression Identifies an Early Stage of Myogenesis and Promotes Clonal Expansion of Muscle Cells. *J Cell Biol* 1998; 142(2):537-544.
26. Durigan, JLQ; Messa, SP; Delfino TL; Salvini, TF. Effects of alternagin-c from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. *Toxicon* 2008; 5: 687-694.
27. Eisenberg BR, Salmons S. The reorganization of sub cellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. *Cell Tissue Res* 1981; 220:449-471.
28. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach, GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol* 1992; 262: 356-363.
29. Goldspink G. Gene expression in muscle in response to exercise. *J Muscle Res Cell Motil* 2003 24: 121–126.
30. Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology* 2005; 20: 232–238.
31. Goldspink G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fiber mass and phenotype. *Adv Exerc Sports Physiol* 1999; 5:27-39.

32. Goldspink G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1998; 120:5-15.
33. Gomez, M. The physiology and biochemistry of soft tissue healing. *Rehabilitation of Injured Knee* 1995; 34-44.
34. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:589-610.
35. Gunning P, Hardeman E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J* 1991; 5:3064-3070.
36. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91:534–551.
37. Hooper SL, Thuma JB. Invertebrate Muscles: Muscle Specific Genes and Proteins. *Physiol Rev* 2005; 85: 1001–1060.
38. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84: 822-832.
39. Inhofe PD, Grana WA, Egle D, Min KW, Tomasek J. The effects of anabolic steroids on rat tendon. An ultrastructural, biomechanical, and biochemical analysis. *Am J Sport Med* 1995; 23:227–232.
40. Iorga B, Adamek N, Geeves MA. The slow skeletal muscle isoform of myosin shows kinetic features common to smooth and non-muscle myosins. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(6): 3559–3570.
41. Irintchev, M. Zweyer, R.N. Cooper, G.S. Butler-Browne and A. Wernig, Contractile properties, structure and fiber phenotype of intact and regenerating slow-twitch muscles of mice treated with cyclosporin A, *Cell Tissue Res.* 308 2002, pp. 143–156.
42. Jackubiec-Puka A, Ciechomska I, Morga J, Matusiak A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part* 1999; 122: 355-362.
43. Jansen KM, Pavlath GK. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *The Journal of Cell Biology* 2006, 174(3):403–413.
44. Jaschinski F, Schuler M, Peuker H, and Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:365–370.

45. Kirkendall DT, Garrett WEJ. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin. Orthop. Relat. Res* 2002; 403: 81–89.
46. Kjær M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to Mechanical loading. *Physiol Rev* 2004; 84:49–698.
47. Kook SH, Hyun JL, Wan TC, Hwang IH, Lee SA, Kim BS. Cyclic Mechanical Stretch Stimulates the Proliferation of C2C12 Myoblasts and Inhibits Their Differentiation via Prolonged Activation of p38 MAPK, Molecules and cells 2008, 25 (4): 479-486.
48. Koskinen SO, Wang W, Ahtikoski AM, Kjær M, Han XY, Komulainen J, Kovanen V, and Takala TES. Turnover of basement membrane type IV collagen in exercise-induced skeletal muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 1292– 1300.
49. Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zang W, Kang JS. Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J. Cell Science* 2005; 118:2355-2362.
50. 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.
51. Kurokawa K, Abe S, Sakiyama K, Takeda T, Ide T, Ishigami K. Effects of stretching stimulation with different rates on the expression of MyHC mRNA in mouse cultured myoblasts. *Biomed Res* 2007; 28(1): 25-31.
52. Larsson L, Muller U, Li X, Schiaffino S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol Scand* 1995;153:109-116.
53. Lefeuvre B, Crossin F, Fontaine-Perus J, Bandman E, Gardahaut MF. Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. *Mech Dev* 1996; 58(1-2):115-127.
54. Liang CS, Kobiyama A, Shimizu A, Sasaki T. Fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of medaka *Oryzias latipes* enrolled in temperature adaptation. *Physiol Genomics* 2007; 29:201–214.
55. Libera LD, Carpena E. Myosin heavy and light chains and myosin light chain kinase in skeletal and smooth muscle of some wild avian species. *Comp Biochem Physiol* 1997; 116(B):45-50.

56. Lieber RL. *Skeletal Muscle Structure and Function – Implications for Rehabilitation and Sports Medicine*, 1992.
57. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64:327-336.
58. Loughna PT, Morgan MJ. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1999; 439:52-55.
59. Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE. Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development. *Developmental Biology* 1999; 216, 312-326.
60. Lutz GJ, Razzaghi S, Lieber RL. Cloning and characterization of the S1 domain of four myosin isoforms from functionally divergent fiber types in adult *Rana pipiens* skeletal muscle. *Gene* 2000; 250:97-107.
61. Maier A, Gorza L, Schiaffino S, Pette D. A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast to slow fiber transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 59-68.
62. Maravelias C, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett* 2005; 158:167–175.
63. Marqueti RC, Nivaldo MS, Parizotto A, Chrigger RS, Perez SEA, Araujo HSS. Androgenic Anabolic Steroids Associated With Mechanical Loading Inhibit Matrix Metalloproteinase Activity and Affect the Remodeling of the Achilles Tendon in Rats. Departamento de Ciências Fisiológicas and Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos 2006.
64. Marqueti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OHP, Perez SEA, Carvalho HF, Araujo HSS. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effect of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol* 2008.
65. Massova L.P. Kotra, R. Fridman and S. Mobashery. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification, *FASEB Journal* 1998; pp. 1075–1095.

66. McClung JM, Meh 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: 1543–1552.
67. Mckoy G, Hou Y, Yang SY, Vega Avelaira D, Degens H, Goldspink G, Coulton GR. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J Appl Physiol* 2005; 98: 2337–2343.
68. McPherron A and Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 12457–12461.
69. Mesquita RA, Micocci KC, Perez S, Salvini TF, Selistre-de-Araújo, HS. Remodelamento muscular induzido por treinamento: expressão de miosina em músculo esquelético de rato - uma análise qualitativa. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2004; 8:117-122.
70. Michna H. Organisation of collagen fibrils in tendon, changes induced by an anabolic steroid. Functional and ultrastructural studies. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1986; 52:75–86.
71. Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int Orthop* 1987; 11:157–162.
72. Miles JW, Grana WG, Egle D, Min KW, Chitwood J. The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg* 1992; 74:411–422.
73. Miyabara EH, Aoki MS, Moriscot AS. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(4): 559-63.
74. Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res.* 2005; 319 :479-89.
75. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(4): C1128–C1138.
76. Mottram DR, George AJ. Anabolic steroids. *Baillière's best practice and research. Bailliere Clin Endocrinol Meth* 2000; 14:55–69.

77. Murphy AM. Contractile protein phenotypic variation during development. *Cardiovascular Research* 1996; 31:25-33.
78. O'Neill DS, Zheng D, Anderson WK, Dohm GL, Houmard JA. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 1999; 45:414-419.
79. Pärssinen M, Karila T, Kovanen V, Seppälä The effect of supraphysiological doses of anabolic androgenic steroids on collagen metabolism. *Int J Sports Med* 2000; 21:406–4.
80. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy research and Technique* 2000; 50: 500-509.
81. Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; 120, 116-202
82. Pette D. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Historical perspectives: plasticity of mamalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1119-1124.
83. Reggiani C, Bottinelli R, Stienen GJM. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol Sci* 2000; 15: 26-33.
84. Sakiyama K, Abe S, Tamatsu Y, Ide Y. Effects of stretching stress on the muscle contraction proteins of skeletal muscle myoblasts. *Biomed Res.* 2005; 26(2): 61-68.
85. Salmons S, Vrbová G. The influence of activity on some contratile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol* 1969; 201(3): 535-549.
86. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 26:371-423.
87. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496:3-22.
88. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006; 20: 1692–708.
89. Sieck GC, Regnier M. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: Invited Review: Plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90, 1158-1164.

90. Solomon AM, Bouloux PMG. Modifying muscle mass – the endocrine perspective. *Journal of Endocrinology* 2006; 191: 349–360.
91. Staron RS, Johnson P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp Biochem* 1993; 204:569-573.
92. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos G. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 1999; 111:117-123.
93. Staron RS, Pette D. The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem J* 1987; 243:695-699.
94. Tannu NS, Rao VK, Chaudhary RM, Giorgianni F, Saeed AE, Gao Y, Raghov R. Comparative Proteomes of the Proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Mol Cell Proteomics* 3 2004; 1065-1082
95. Taylor Wayne E, Shalender Bhasin, Jorge Artaza, Frances Byhower, Mohd Azam, Darril H. Willard, Jr., Frederick C. Kull, Jr., and Nestor Gonzalez-Cadavid. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E221–E228.
96. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S Bass J, Myostatin, a negative regulation of muscle growth functions by inhibiting myoblast proliferation, *the journal of biological chemistry* 2000, 275: (51): 40235-40243.
97. Verzola RMM, Mesquita RA, Peviani S, Ramos OHP, Moriscot AS, Perez S, Selistre-de-Araújo, HS. Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39:621-627.
98. Weiss A, Leinw LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annual Reviews Cell & Developmental Biology* 1996; 12: 417-439.
99. Yang P, Baker KA, Hagg T. The ADAMs family: Coordinators of nervous system development, plasticity and repair *Progress in Neurobiology* 2006; 79:73–94.

100. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biology* 2000; 19: 623-629.
101. Zammit PS, Golding J P, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 2004; 166, 347-357.

ANEXO 1:



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

Submissões Ativas

| ATIVO | | ARQUIVO | | | |
|--|---------------------|------------------|--|-----------------------|--|
| ID | MM-DD ENVIAR SEC | AUTORES | TÍTULO | STATUS | |
| RBFIS-11-13 879 | | ARTORIG piovesan | EFEITO DO ANABOLIZANTE DECANOATO DE NANDROLONA NA... | Aguardando designação | |
| 1 a 1 de 1 Itens | | | | | |
| <p>Iniciar Nova Submissão</p> <p>CLIQUE AQUI 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