ANDRÉ LUÍS FERNANDES DOS SANTOS

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NO FENÓTIPO DISTRÓFICO EM CAMUNDONGO
MODELO PARA DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2012

ANDRÉ LUÍS FERNANDES DOS SANTOS

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES NA REGENERAÇÃO
MUSCULAR E NO FENÓTIPO DISTRÓFICO EM CAMUNDONGO
MODELO PARA Distrofia muscular congênita**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Mariz Vainzof

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santos, André Luís Fernandes dos.

Efeito dos hormônios esteróides na regeneração muscular e no
fenótipo distrófico em camundongo modelo para distrofia muscular
congenita / André Luís Fernandes dos Santos. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Mariz Vainzof.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética.

Versão do título para o inglês: Steroid hormones effects in muscle
regeneration and dystrophic phenotype of congenital muscular dystrophy
mouse model.

1. Modelos animais 2. Distrofias musculares progressivas 3. Esteróide
4. Miostatina I. Vainzof, Profa. Dra. Mariz II Universidade de São
Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan. Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0127/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): André Luis Fernandes dos Santos.

Título da Tese: Efeito dos hormônios esteróides na regeneração muscular e no fenótipo distrófico em camundongo modelo para distrofia muscular congênita.

Orientador(a): Profa. Dra. Mariz Vainzof.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/027/2010
Ref. 2010.1.846.41.6

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB, em reunião realizada no dia 17/08/2010, **APROVOU** o Projeto “Efeitos dos esteróides anabilizantes na expressão da miostatina em camundongos C57Bl, mdx, Large^{myd} e dy^{2j}/dy^{2j}” – **Protocolo 113/2010**, de sua responsabilidade (Colaborador: André Luís Fernandes dos Santos).

Atenciosamente.

Profa. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Profa. Dra. MARIZ VAINZOF

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo
aos meus sonhos e pela abnegação. Eu os amo!!!

À minha sobrinha Giovanna (“Papitcho”). Saudades
dos nossos passeios pelas ruas do Rochdalle. Inesquecíveis
calças “perna de grilo”!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pela outorga da bolsa de doutorado.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Mariz Vainzof, pela oportunidade de realizar minha tese de doutorado em seu laboratório e pela confiança, apesar dos percalços de um iniciante em Biologia Molecular. Shalom!

Às minhas colegas de pós-graduação, pelos bons momentos e aprendizado. Misterioso é o universo feminino! Confiem sempre, pois o tempo é o melhor “remédio” para tudo!

À Lydia pela paciência e primeiras lições com as pipetas, PCRs e tudo que compõe o complexo universo da Biologia Molecular. Obrigado pelos conselhos e apoio. Nunca se esquecendo das planilhas e do MDE (sempre RYR), é claro!

À Priscila, pela confiança nos momentos mais difíceis e pela ajuda, incomensurável, na conclusão desta tese. Que você tenha êxito em sua carreira acadêmica e continue trabalhando, sempre!

À minha querida Débora pelo amor a mim dedicado e paciência com este canceriano em suas questões existenciais !!!

Aos meus tios Mêrian, Elias e Noé por me ensinarem o amor aos estudos.

Ao Biotério da Faculdade de Medicina e aos seus funcionários, pelo fornecimento de parte dos animais para este trabalho. À Cláudia e Heloísa pelo fornecimento dos animais, amizade, confiança e conversas sobre a vida.

À Martinha pela ajuda com os HE e por sua jovialidade e espontaneidade. Obrigado!

À Simone e ao Lucas pela ajuda nos arrays (array = OCNIM=objeto científico não identificado e místico). Muito obrigado!

Agradeço aos funcionários do Genoma por proporcionar boas condições para o desenvolvimento do nosso trabalho, além dos conselhos e conversas muito divertidas nos momentos de descontração.

*Sángiri-làgiri,
Olàgiri-kàkààkà-kí Igba Edun Bò
O Jajú Mó Ni Kó Tó Pa Ni Je
Ó Ké Kàrà, Ké Kòró
S' Olórò Dì Jínjìnnì
Eléyinjú Iná
Abá Won Jà Mà Jèbi
Iwo Ní Mo Sá Dì O
Sango Ona Mogba Bi E Tu Bá Wó Ile
Jejene Ni Mú Ewure
Bi Sango Bá Wó Ile
Jejene Ni Mú Osa Gbogbo*

Que racha e lasca paredes
Ele deixou a parede bem rachada e pôs ali duzentas pedras de raio
Ele olha assustadoramente para as pessoas antes de castigá-las
Ele fala com todo o corpo
Ele faz com que a pessoa poderosa fique com medo
Seus olhos são vermelhos como brasas
Aquele que briga com as pessoas sem ser condenado, porque nunca briga injustamente
É em ti que busco meu refúgio
Se um antílope entrar na casa
A cabra sentirá medo
Se Sango entrar na casa
Todos os Orisa sentirão medo

RESUMO

SANTOS, A. L. F. **Efeito dos hormônios esteróides na regeneração muscular e no fenótipo distrófico em camundongo modelo para distrofia muscular congênita.** 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As afecções neuromusculares humanas constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração muscular progressiva, levando ao desenvolvimento de fraqueza muscular e perda de capacidade motora. Há um esforço mundial para o estabelecimento de terapias eficazes para estas afecções. A miostatina, membro da família TGF-beta, é um agente regulador negativo do crescimento muscular. Estudos preliminares mostraram que a miostatina tem ação direta nas células-satélites, responsáveis pela formação dos miotubos e, conseqüentemente, pela reposição das fibras musculares subtraídas durante o processo distrófico. Na terapia de suplementação com testosterona observou-se adiminuição na expressão da miostatina e ausência de atrofia muscular, sugerindo um importante papel dos esteróides anabolizantes na regulação do crescimento e regeneração muscular, com envolvimento da miostatina. Este trabalho tem como objetivo determinar a influência dos esteróides anabolizantes na expressão do gene da miostatina, dos genes da cascata de regeneração (MyoD, Myf-5 e miogenina) e da via do BMP (Noggin, BMP-4 Id-1), no músculo quadríceps, em camundongos normais, C57BL/6 e no modelo distrófico *Large^{myd}* e como o tratamento influenciará o desempenho em avaliações funcionais no modelo distrófico. Utilizamos a técnica de PCR em tempo real, com GAPDH como gene endógeno, para determinarmos a expressão relativa dos genes. O peso dos animais foi mensurado semanalmente e os animais *Large^{myd}* foram avaliados funcionalmente, no início e final do experimento. Os animais tratados apenas com esteróide, normais e distróficos, apresentaram aumento significativo em seu peso corpóreo, com melhora de desempenho nas avaliações funcionais no *Large^{myd}*. O aumento no peso corpóreo destes animais não se deveu a hipertrofia, pois não houve aumento do diâmetro das fibras musculares. Não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene da miostatina no músculo normal e distrófico. Nos animais normais, o tratamento com Flutamida, um antagonista competitivo do receptor de andrógeno, estimulou a cascata de regeneração. Concluimos que o uso do esteróide anabolizante foi benéfico para o aumento na força do modelo *Large^{myd}*, mas o aumento de massa corpórea nestes animais, como no camundongo normal, não está relacionado com a inibição da expressão da miostatina ou a ativação de genes ligados à proliferação celular, como os genes da cascata de regeneração e via do BMP.

Palavras-chave: Miostatina. Esteróide anabolizante. Camundongos modelos. Distrofias musculares.

ABSTRACT

SANTOS, A. L. F. **Steroid hormones effects in muscle regeneration and dystrophic phenotype of congenital muscular dystrophy mouse model.** 2012. 126 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Human neuromuscular affections constitute a heterogeneous group of genetic diseases characterized by progressive muscle degeneration, leading to increasing muscle weakness and loss of motor capacity. There is a worldwide effort to the establishment of effective therapies for these diseases. Myostatin, a member of the TGF-beta family, is a negative regulator agent of muscle growth. Preliminary studies showed that myostatin has a direct action in satellite cells, responsible for myotubes formation and, consequently, for reposition of removed muscle fibers during the dystrophic process. In the testosterone supplementation therapy we observed decreased myostatin expression and absence of muscle atrophy, suggesting an important role of anabolic steroids in the regulation of muscle growth and regeneration, with myostatin involvement. The aim of this project is to determine the influence of anabolic steroids in the expression of myostatin genes, regeneration cascade genes (MyoD, Myf-5 and myogenin), and BMP pathway (Noggin, BMP-4, Id-1), in the quadriceps muscle in normal C57BL/6 mice and in the dystrophic model *Large^{myd}* and how the treatment will influence the performance in functional evaluations in the dystrophic model. We used the Real Time PCR assay, with GAPDH as endogenous gene to determine the relative expression of genes. The animals body weight was measured weekly and the *Large^{myd}* animals were functionally evaluated in the beginning and at the end of the experiment. Animals treated only with steroids, control and dystrophic, presented significant increase in body weight and *Large^{myd}* showed improvement in the functional evaluations. The increase in body weight was not due to hypertrophy, because there was no increase in muscle fiber diameter. There weren't significant differences in the myostatin gene expression in the normal and dystrophic muscle. In the normal animals, the treatment with Flutamida, a competitive antagonist of the androgen receptor, stimulated the regeneration cascade. We concluded that the use of anabolic steroid was benefic to the increase of the strength in the *Large^{myd}* model, but the increase of body weight in these animals, as in the normal mice, is not related to the inhibition of myostatin expression or the activation of genes related to cell proliferation, as the regeneration cascade genes and BMP pathway.

Keywords: Myostatin. Anabolic steroid. Mouse models. Muscular dystrophies.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Primers utilizados na reação de PCR em tempo real, suas sequências forward e reverse, tecidos utilizados para padronização e suas características (limiar, slope, R2)	56
Quadro 2- Identificação dos animais e tratamentos realizados-experimento 1	59
Quadro 3- Identificação dos animais e tratamentos realizados-experimento 2	60
Quadro 4- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância do gene da miostatina no grupo controle (S) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,05$	66
Quadro 5- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes MyoD, Myf-5 e miogenina no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$	68
Quadro 6- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes Noggin, BMP-4 e Id- 1 no grupo controle (salina) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$	70
Quadro 7- Análise de microarranjo de DNA nos animais normais, mostrando os genes diferencialmente expressos nos grupos que receberam Decadurabolin diretamente (D) ou após Flutamida (FD), e naqueles sob ação da testosterona endógena após Flutamida (FE) em relação ao grupo controle (salina)	72
Quadro 8- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância da expressão do gene da miostatina para os grupos controle (<i>Wild-type</i> salina, LG salina e LG não tratado) e comparações entre grupos LG salina com <i>Wild-type</i> salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa).....	89
Quadro 9- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância do gene da miostatina no grupo controle (LG salina) e diferentes grupos experimentais. Em azul: $p < 0,05$	90
Quadro 10- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância do gene da miostatina para os grupos controle (<i>Wild-type</i> salina, LG salina e LG não tratado) e comparações entre grupos LG salina com <i>Wild-type</i> salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa). Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$	92
Quadro 11- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes da cascata de regeneração no grupo controle (LG salina) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $0,05$	94
Quadro 12 - Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes da via do BMP para os grupos controle (<i>Wild-type</i> salina, LG salina e LG não tratado) comparações entre grupos LG salina com <i>Wild-type</i> salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa). Em lilás: $p < 0,01$	96

Quadro 13- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes da via do BMP para o grupo LG salina e demais grupos tratados. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$ 98

Quadro 14- Análise de microarranjo de DNA no grupo LG Decadurabolin, mostrando os genes diferencialmente expressos em relação ao grupo LG não tratado101

Quadro 15- Resumo dos resultados obtidos, comparado os grupos experimentais ao controle (grupo salina). Seta verde: sem diferenças significativas. Seta azul: aumento significativo ($p < 0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p < 0,05$).....103

Quadro 16- Resumo dos resultados obtidos no experimento 2, comparando o grupo LG salina com os outros grupos controle (*Wild-type* salina e LG não tratado). Seta verde: sem diferenças significantes; seta azul: aumento significativo ($p < 0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p < 0,05$)110

Quadro 17- Resumo dos resultados obtidos no experimento 2, comparando o grupo LG salina com os demais grupos experimentais. Seta verde: sem diferenças significantes; seta azul: aumento significativo ($p < 0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p < 0,05$)111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Derivação das células precursoras musculares durante a embriogênese do camundongo	20
Figura 2- Fatores que modulam as atividades das células-satélites	21
Figura 3- A) Expressão de MyoD e Myf-5 no ciclo celular do mioblasto. B) Fatores envolvidos a miogênese	22
Figura 4- A) Organização do músculo esquelético. Cada músculo é composto de muitos feixes de fibras musculares. Cada fibra muscular é composta por muitas miofibrilas, as quais são compostas por miofilamentos. B) Eletromicrografia de fibra muscular.	24
Figura 5- Complexo distrofina glicoproteínas associadas (CDGA)	25
Figura 6- Ativação, diferenciação e proliferação de células satélites na resposta a lesão muscular	27
Figura 7- Processamento pós-traducional da miostatina	28
Figura 8- Vias de sinalização da miostatina (em destaque a via canônica); em azul o ActRI e em rosa o ActRIIB	29
Figura 9- Atuação da miostina no processo de proliferação e diferenciação das células-satélites (A) e ausência de sua atuação (B)	32
Figura 10- A via do BMP	35
Figura 11- Progressão da sinalização do BMP-4 durante a regeneração muscular e a influência desta sobre as células satélites	36
Figura 12 – Relação entre as vias do TGF-beta/Activina (miostatina) e BMP-Smad (BMP-4) com as de sinalização de ERK-MAPK, Wnt e JAK-STAT	38
Figura 13- Relação entre miostatina e IGF-1 e destes com as vias de Akt (Akt/mTOR, Akt/FoxO e Akt/GSK-3beta).	39
Figura 14- Função do receptor de andrógeno na regulação da transcrição	41
Figura 15- O Complexo distrofina glicoproteínas associadas (CDGA)	47
Figura 16- A relação alfa-distroglicana/carboidratos (círculos cinza)/laminina com a integridade do CDGA. Demarcado em verde (à esquerda) a desestruturação do complexo, decorrente a mutação do gene LARGE no modelo <i>Large^{myd}</i> , à direita o complexo normal....	49
Figura 17- A histologia muscular dos animais <i>Large^{myd}</i>	50

Figura 18- Genotipagem dos camundongos <i>Large^{myd}</i> . Eletroforese dos produtos de PCR multiplex em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo	53
Figura 19- Variação do peso corpóreo dos animais dos grupos controle (S), Deca (D), tratados com Flutamida durante 30 dias (em roxo), FD e FE (*p<0,05)	63
Figura 20- Média da mensuração do diâmetro das fibras musculares e histologias (HE, 200x) no grupo controle (S) e demais grupos experimentais (* = p<0,05)	65
Figura 21- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina no grupo controle (salina) e nos demais grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = p<0,05)	67
Figura 22- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes MyoD, Myf-5 e miogenina no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, mediana de cada grupo (* = p<0,05)	69
Figura 23- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes BMP-4, Noggin e Id-1 no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = p<0,05)	71
Figura 24- Análise das vias do grupo D comparado ao grupo controle (S), vias 1 e 2, com genes do receptor de Activina IC, Smad2, receptor de andrógeno, MyoD (via 1) e miosina (via 2) circulados. Em vermelho: expressão aumentada. Em verde: expressão diminuída. Em branco: expressão inalterada	73
Figura 25- Análise das vias dos grupos FD e FE comparados ao grupo controle (S), com genes do receptor de Activina IC e Smad2 circulados. Em verde: expressão diminuída. Em branco: expressão inalterada	74
Figura 26- Média do aumento/decréscimo do peso corpóreo nos grupos <i>Wild-type</i> salina, LG salina, LG Decadurabolin, tratados com Flutamida por 30 dias (F e FE) e LG Flutamida +testosterona endógena (* = p<0,05)	78
Figura 27- Média da mensuração do diâmetro das fibras musculares e histologias (HE, 200x) nos grupos controle (<i>Wild-type</i> salinae LG salina) e demais grupos experimentais(*=p<0,05)	80
Figura 28- Média da força de todos os animais <i>Large^{myd}</i> pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais na avaliação funcional pós-tratamento, força- <i>Grip strength</i> nas patas dianteiras (GD) (*=p<0,05)	85
Figura 29- Média da força de todos os animais <i>Large^{myd}</i> pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional força- <i>Grip strenght</i> nas patas traseiras (GT) (*=p<0,05)	86
Figura 30- Média do tempo suspensão de todos os animais <i>Large^{myd}</i> pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional resistência nos membros anteriores (RMA)	88

Figura 31- Média do tempo suspensão de todos os animais <i>Large^{myd}</i> pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM)	88
Figura 32- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina para os grupos controle: <i>Wild-type</i> salina e LG salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) e comparação do grupo LG salina com <i>Wild-type</i> salina e LG não tratado	90
Figura 33- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana decada grupo (* = $p < 0,05$)	91
Figura 34- Quantificação das expressões relativas dos genes da cascata de regeneração para os grupos controle: <i>Wild-type</i> salina e LG salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) e comparações entre LG salina com <i>Wild-type</i> salina e LG não tratado (*= $p < 0,05$)	93
Figura 35- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes da cascata de regeneração no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$)	95
Figura 36- Quantificação das expressões relativas dos genes da via do BMP para os grupos controle: normal salina e LG salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) comparações entre LG salina com <i>Wild-type</i> salina e LG não tratado (* = $p < 0,05$)	97
Figura 37- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes da via do BMP no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$)	99
Figura 38- Análise das vias do grupo LG salina comparado ao grupo <i>Wild-type</i> salina. Em vermelho: expressão aumentada. Em verde: expressão diminuída	100
Figura 39- Análise das vias do grupo LG Decadurabolin comparado ao grupo LG não tratado, vias 1 e 2, com genes do receptor de Activina IC, Smad2, receptor de andrógeno, MyoD (via 1) e miosina (via 2) circulados. Em vermelho: expressão aumentada. Em verde: expressão diminuída	102
Figura 40- Mecanismos de ação dos andrógenos nos músculos perineais e dos membros...	107

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Variação individual do peso corpóreo dos animais normais, após 35 dias, nos diferentes tratamentos realizados62
- Tabela 2-** Média do aumento/decréscimo no peso, desvio-padrão e nível de significância(p) no teste Mann-Whitney, comparando cada grupo experimental/tratamento com o grupo controle (S). Em azul: $p<0,05$ 63
- Tabela 3-** Média das mensurações dos diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio no grupo controle (S) e demais grupos experimentais. Em lilás: $p<0,01$. Em azul: $p<0,05$ 64
- Tabela 4-** Resultado da genotipagem, valores individuais das medidas de massa (pré e pós-tratamento) e variação na massa nos animais normais (grupo *Wild-type* salina) e afetados nos diferentes tratamentos76
- Tabela 5-** Média do aumento do peso corpóreo nos grupos *Wild-type* salina, LG salina e LG Decadurabolin, tratados com Flutamida por 30 dias (F e FE) e LG Flutamida+testosterona endógena. Em lilás: $p<0,01$ 78
- Tabela 6-** Média da mensuração dos diâmetros das fibras do músculo gastrocnêmio nos grupos controles (*Wild-type* salina e LG salina) e nos demais grupos experimentais (* $p<0,05$). Em lilás $p<0,01$. Em azul: $p<0,05$ 79
- Tabela 7-** Resultados obtidos nas avaliações Força -*Grip strength* nas patas dianteiras (GD) e nas patas traseiras (GT) nos grupos controle (*Wild-type* salina e LG salina) e demais grupos experimentais, pré (em azul) e pós-tratamento (em rosa)82
- Tabela 8-** Resultados obtidos nas avaliações resistência nos membros anteriores (RMA), resistência e equilíbrio quatros membros (REQM) nos grupos controle (*Wild-type* salina e LG salina) e demais grupos experimentais, pré (em azul) e pós-tratamento (em rosa)83
- Tabela 9-** Médias e níveis de significância para avaliação funcional força-*Grip strength*, patas dianteiras (GD), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul). Em lilás: $p<0,01$ 84
- Tabela 10-** Médias e níveis de significância para avaliação funcional força-*Grip strength*, patas dianteiras (GT), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul). Em lilás: $p<0,01$ 85
- Tabela 11-** Médias e níveis de significância para a avaliação funcional resistência nos membros anteriores (RMA), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul)87
- Tabela 12-** Médias e níveis de significância para a avaliação funcional resistência e equilíbrio nos quatro membros nos membros anteriores (REQM) em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul)87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV- Vírus adeno-associado

ActRI- Receptor de Activina tipo I

ActRIIB- Receptor de Activina tipo IIB

AMP cíclico- 3'-5'-monofosfato de adenosina

AMPK- AMP-ativado por proteína kinase

BMP- Fatores morfogenético do osso

BMP-1/TLD- Fator morfogenético do osso-1/toloidina

CDGA- Complexo distrofina-glicoproteínas associadas

Cdk2- Ciclina dependente de kinase 2

CS- Células-satélites

Deca- Decadurabolin

DMC- Distrofias musculares tipo Cinturas (DMC)

DMD- Distrofia Muscular de Duchenne

DN- Decanoato de nandrolona

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ERA- Elementos responsivos a andrógenos

FoxO- Forkhead box O

FSH- Hormônio folículo estimulante

GASP-1- Fator de crescimento e diferenciação associado a proteína sérica 1

GD- *Grip Strenght* patas dianteiras

GH- Hormônio de crescimento

GnRH- Hormônio liberador de gonadotrofinas

GT- *Grip Strenght* patas traseiras

HSP- Proteínas de choque térmico

HE- Coloração de hematoxilina e eosina

HLH- Helix-loop-helix

Id- Inibidor de diferenciação

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

JAK-STAT- Sinais transdutores e ativadores de transcrição

LDH- lactato desidrogenase

LG- *Large^{myd}*

LH- Hormônio luteinizante

LTBP3- TGF-beta latente ligado a proteína 3

MAFbx- Muscle Atrophy F-box

mRNA- RNA mensageiro

Mstn-Gene da miostatina

MuRF1- Muscle RING-finger protein-1

Myf- Fatores de transcrição miogênicos

NOG- Noggin

p21- Inibidor de kinase dependente de ciclina1A

Pax7- Paired box transcription factor 7

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PFK- Fosfofrutoquinase

RA- Receptor de andrógeno

Rb- Proteína do retinoblastoma

REQM- Resistência e equilíbrio nos quatro membros

RMA- Resistência nos membros anteriores

TGF-beta- Fator transformador do crescimento beta

TNF-alfa- Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 A miogênese.....	20
1.2 Estrutura e função muscular.....	23
1.3 Tipos de fibras musculares.....	25
1.4 A regeneração muscular.....	26
1.5 A miostatina.....	28
1.6 Os Fatores morfogênicos do osso (BMP).....	34
1.7 As interações entre miostatina, BMP, genes da cascata de regeneração e destes com outras vias de sinalização.....	36
1.8 Andrógenos.....	39
1.8.1 Síntese e funções.....	39
1.8.2 Receptor de andrógeno.....	41
1.8.3 Esteróides anabolizantes.....	42
1.9 Os andrógenos/esteróides e o músculo esquelético: aumento na síntese protéica, células-satélite e miostatina.....	43
1.10 Antiandrógenos.....	45
1.11 As doenças neuromusculares.....	46
1.11.1 As distrofias musculares progressivas.....	46
1.11.2 Modelos murinos para distrofias musculares.....	48
2 OBJETIVOS.....	51
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Obtenção dos animais e manutenção da colônia.....	52
3.2 Genotipagem da linhagem <i>Large^{myd}</i>	52
3.3 Congelamento das amostras musculares.....	53
3.4 Preparação das lâminas e a coloração de hematoxilina-eosina (HE).....	53
3.5 Mensuração das fibras musculares.....	54
3.6 Extração de RNA total.....	54
3.7 Síntese de cDNA.....	55
3.8 PCR em tempo real (Real-Time PCR-Q PCR)-quantificação relativa.....	55
3.9 Análise por Microarranjos de expressão de DNA (<i>Microarray</i>).....	57
3.10 Avaliações funcionais.....	57

3.10.1 Força-Grip strength	57
3.10.2 Resistência nos membros anteriores (RMA)	58
3.10.3 Resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM)	58
3.11 Delineamento experimental	58
3.11.1 Experimento 1- Efeitos dos esteróides anabolizante no músculo normal	58
3.11.2 Experimento 2- Efeitos dos esteróides anabolizante no músculo distrófico	59
3.12 Análise estatística.....	60
4 RESULTADOS	61
4.1 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo normal	61
4.1.1 Avaliação do peso corpóreo	61
4.1.2 Mensuração das fibras musculares	63
4.1.3 Análise das quantificações das expressões relativas dos genes estudados	66
4.1.4 Análise por Microarranjos de expressão de DNA (Microarray)	72
4.2 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico	75
4.2.1 Avaliação do peso corpóreo	75
4.2.2 Mensuração das fibras musculares	79
4.2.3 Análise funcional do músculo normal e distrófico	81
4.2.3.1 Teste de Força	84
4.2.3.2 Teste de Suspensão pelas patas	86
4.2.4 Análise das quantificações das expressões relativas dos genes estudados.....	89
4.2.5 Análise por Microarranjos de expressão de DNA (Microarray) no músculo distrófico.....	100
5 DISCUSSÃO	103
5.1 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo normal	103
5.2 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico	110
6 CONCLUSÕES	116
6.1 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo normal	116
6.2 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico	116
REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 A miogênese

O músculo esquelético é formado a partir do mesoderma paraxial, segmentado em somitos. A porção dorsal dos somitos originará os músculos dos membros e do corpo. Durante a embriogênese os músculos da cabeça, tronco e membros são formados separadamente. Os somitos subdividem-se em dois domínios: dorsomedial (epaxial) e ventrolateral (hipoaxial). A região dorsomedial originará a musculatura dos membros, abdominal e intercostal (HAWKE; GARRY, 2001) (Fig. 1).

Figura 1- Derivação das células precursoras musculares durante a embriogênese do camundongo.

Fonte: Modificado de Hawke e Garry (2001).

A miogênese é um processo que inclui a especificação e a diferenciação dos mioblastos, que se fundem para formar os miotubos primários e secundários. Todos esses eventos dão-se sob o controle genético restrito e envolvem a migração de células precursoras. Genes da família Pax, como Pax7 (Paired box transcription factor 7), expresso em células-satélites (CS) quiescentes e em proliferação, atuam na proliferação de várias linhagens de precursores e ligam-se a sequências específicas do DNA, fato que sugere a regulação de genes alvo (LANGLEY et al., 2002; MUNTONI et al., 2001). As CS, em seu estado quiescente, constituem uma população de mioblastos indiferenciados, localizados na superfície da fibra em desenvolvimento, entre o sarcolema e a lâmina basal. Neste momento encontram-se na fase G0 da intérfase e apresentam citoplasma pequeno e cromatina condensada (MUNTONI et al., 2001; TSIVITSE, 2010). São consideradas células-tronco unipotentes, apenas com

capacidade de diferenciação miogênica (BURDZINSKA; GALA; PACZEK, 2008). Durante o crescimento da fibra muscular ou seu reparo, as CS entram no ciclo celular, proliferam e fundem-se às fibras musculares existentes (CHAKKALAKAL et al., 2005; LEE, 2004). Comunicam-se com as miofibras via proteínas de adesão muscular, incluindo M e N-caderina, e com a lâmina basal via integrinas, particularmente a integrina $\alpha 7\beta 1$ (ZAMMIT, 2008). Sabe-se que aproximadamente 2 a 5% dos núcleos no músculo de camundongos adultos são provenientes das CS (BURDZINSKA; GALA; PACZEK, 2008). Além de Pax7, outros fatores regulam a atividade das CS, entre eles os fatores de crescimento, hormônios e citocinas (HAWKE; GARRY, 2001) (Fig.2).

Figura 2- Fatores que modulam as atividades das células- satélites.

Fonte: Modificado de Hawke e Garry (2001).

Os Fatores de transcrição miogênicos (Myfs), tais como o MyoD (ou Myf-3) e Myf-5, pertencem a família protéica HLH (*helix-loop-helix*), são um grupo de proteínas que compartilham uma sequência comum, constituída por vários aminoácidos básicos, fundamental para ligação com o DNA e a regulação da transcrição (WONG; WANG; LING, 2004). Além do controle da transcrição, MyoD também regula a expressão gênica e é essencial no reparo de lesões musculares, pois participa da ativação das CS. Myf-5 também participa na determinação dos mioblastos durante o desenvolvimento embrionário e parece atuar em conjunto com o MyoD, pois a inativação de ambos os genes causa ausência completa dos mioblastos e do músculo esquelético diferenciado (HAWKE; GARRY, 2001; MUNTONI et al., 2001). MyoD e Myf-5 são muito expressos na deficiência de distrofina e

nas doenças musculares inflamatórias (MUNTONI et al., 2001). Nos mioblastos, na fase G1 do ciclo celular, temos altos níveis de MyoD, enquanto o inverso ocorre na transição de G1 para S, ou seja, durante a diferenciação os níveis de MyoD estão elevados e de Myf5 reduzidos (KITZMAN; FERNANDES, 2001). Mioblastos quiescentes não diferenciados (em G0) apresentam um perfil de expressão diferente do anteriormente citado: altos níveis de Myf-5 e baixos de MyoD (KITZMANN; FERNANDES, 2001) (Fig.3A). A miogenina (Myf-4) é um fator essencial para a diferenciação das células totipotentes em músculo. Junto com Myf-6 determinam a linhagem miogênica e modulam a diferenciação final das CS (KITZMANN; FERNANDES, 2001; THOMAS et al., 2000).

Outros fatores estão envolvidos com a miogênese, como os Fatores morfogenético do osso (BMP), miostatina, Fator transformador do crescimento beta (TGF-beta) serão tratados posteriormente (Fig. 3B).

Figura 3- A) Expressão de MyoD e Myf-5 no ciclo celular do mioblasto. B) Fatores envolvidos com a miogênese.

Fonte: Modificado de Muntoni et al. (2001); Kitzmann e Fernandez (2001).

1.2 Estrutura e função muscular

O tecido muscular é constituído por células de morfologia alongada e com grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados, responsáveis pela contração muscular. Conforme sua estrutura e função são classificados em dois tipos: liso e estriado. O músculo estriado é subdividido em cardíaco e esquelético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Fig. 4A).

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas longas e multinucleadas, com estrias transversais. As fibras musculares, que formam cada músculo, possuem contração rápida, vigorosa e sujeita a controle voluntário. Estas fibras se originam da fusão de mioblastos e a observação ao microscópio eletrônico revela que as listras se originam da estrutura em bandas das múltiplas miofibrilas compostas, principalmente, por actina e miosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Fig. 4B).

As miofibrilas, com diâmetro de 1 a 2 μm , localizam-se longitudinalmente à fibra muscular e apresentam repetição de unidades iguais, os sarcômeros. Cada sarcômero é formado, preponderantemente, por miofilamentos de actina e miosina, dispostos longitudinalmente, organizados numa distribuição simétrica e paralela. Intercaladas com a actina estão às moléculas de tropomiosina e troponina, que auxiliam na organização e na ativação da cascata contrátil, pela ligação com o cálcio e exposição dos sítios de ligação da actina às cabeças de miosina (JOHNSON; RAVEN, 2002) (Fig. 4B).

Figura 4- A) Organização do músculo esquelético. B) Eletromicrografia da fibra muscular.

Cada músculo é composto de muitos feixes de fibras musculares. Cada fibra muscular é composta por muitas miofibrilas, as quais são compostas por miofilamentos. A linha Z serve como bordas dos sarcômeros claramente visualizados em cada miofibrila. Os filamentos espessos compõem a banda A, os filamentos finos fazem parte da banda I e da banda A, sobrepondo os filamentos espessos. Na região central da banda A chamada por banda H, não há sobreposição dos filamentos, por isso a aparência mais clara.

Fonte: Modificado de Johnson e Raven (2002).

Os conjuntos das miofibrilas estão ligados ao sarcolema por meio de diversas proteínas, com afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática. A distrofina, por exemplo, é uma proteína de localização sub-sarcolemal, ligada aos filamentos de actina e a um complexo de proteínas integrantes do sarcolema denominado Complexo distrofina-glicoproteínas associadas (CDGA) (ERVASTI; CAMPBELL, 1993; KHURANA; DAVIS, 2003) (Fig.5).

Figura 5- Complexo distrofina glicoproteínas associadas (CDGA).

Fonte: Modificado de Khurana e Davies (2003).

1.3 Tipos de fibras musculares

As fibras musculares podem ser classificadas em tipo I ou tipo II, devido às suas características fisiológicas e bioquímicas. Nesta perspectiva as fibras do tipo I, de contração lenta, geram energia utilizando o sistema aeróbio, com menor velocidade de propagação do cálcio e grande número de mitocôndrias. Recebem maior vascularização e possuem altos níveis de mioglobina. Sua velocidade de contração e relaxamento é baixa, assim como a capacidade de gerar força. Há o predomínio das enzimas oxidativas, como a citrato sintetase e a succinato desidrogenase. Nas fibras do tipo II, de contração rápida, predominam a atividade das enzimas glicolíticas, como a fosfofrutoquinase (PFK) e lactato desidrogenase (LDH) e a energia é gerada em anaerobiose. Apresentam alta velocidade de contração/relaxamento, de condução do potencial de ação e de propagação do cálcio. Possuem grande capacidade de gerar força e baixa resistência à fadiga. São pouco vascularizadas e o seu número de mitocôndrias é menor, quando comparadas às fibras do tipo I. Apresentam quantidade reduzida de mioglobina e alta atividade das ATPases. Há ainda as fibras intermediárias, com características dos dois tipos (BOFF, 2008; KLOVER, 2009).

1.4 A regeneração muscular

A regeneração muscular é um processo coordenado, onde múltiplos fatores são sequencialmente ativados para manter e preservar a estrutura e a função muscular após lesão. Mecanismos anatômicos e moleculares da regeneração são considerados como uma recapitulação da miogênese, porém o processo de regeneração parece ser mais complexo (HAWKE; GARRY, 2001). Possui quatro fases: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose. O evento inicial da degeneração muscular é a necrose das fibras musculares, que pode ocorrer devido a fatores mecânicos, substâncias químicas, entre outros (HIROKI et al., 2011; MUSARÓ et al., 2007). Há a fagocitose do tecido lesionado pelos macrófagos, regeneração das miofibrilas, formação do tecido cicatricial e revascularização (MUSARÓ et al. 2007). A fase proliferativa das células-satélites (CS) dura aproximadamente 2 a 5 dias após a necrose muscular, com expressão de MyoD e Myf-5. Neste momento há a expansão dos mioblastos, oriundos das CS, em resposta a células inflamatórias atraídas pelo processo inflamatório. Após a proliferação miogênica as novas fibras musculares sofrem diferenciação e fundem-se às fibras lesionadas pré-existentes. Com 5 a 7 dias o mioblasto sai do ciclo celular e inicia sua diferenciação, condicionado pela expressão de miogenina e miosina de cadeia pesada (BURDZINSKA; GALA; PACZEK, 2008). Na fase de remodelagem há a contração e reorganização do tecido cicatricial e a recuperação da capacidade funcional do músculo. Após a completa fusão das células miogênicas, as fibras aumentam de tamanho e o mionúcleo move-se para a periferia da fibra (WAGERS; CONBOY, 2005) (Fig. 6).

Figura 6- Ativação, diferenciação e proliferação de células satélites na resposta à lesão muscular.

Fonte: Modificado de Hawke e Garry (2001).

Na lesão muscular traumática o dano muscular resolve-se após o término do ciclo descrito acima. Porém no processo distrófico temos todas as fases da regeneração acontecendo simultaneamente, com a participação de TNF-alfa (Fator de necrose tumoral-alfa) e TGF-beta 1, durante toda a vida do indivíduo acometido por processodistrófico.

O TNF-alfa é uma citocina inflamatória potente, que induz a produção de quemocinas e regula a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, para facilitar a infiltração de células no sítio da inflamação. Participa ativamente dos processos inflamatórios agudos, e está presente durante o dano à fibra muscular (RADLEY; DAVIES; GROUNDS, 2008; WATERS et al., 2010). O TGF-beta-1 é um peptídeo multifuncional que controla a proliferação, diferenciação e outras funções em algumas células. No músculo degenerado, promove a deposição do colágeno, aumento da matriz extracelular e acúmulo de tecido fibrótico (MUNTONI et al., 2001; ZHANG, 2012).

1.5 A miostatina

A miostatina ou GDF-8, codificada pelo gene *Mstn*, é um membro da Família dos fatores de crescimento beta (TGF-beta). O gene *Mstn* encontra-se no cromossomo um humano e dois murino. Possui um arranjo molecular simples: três exons e dois introns. O seu mRNA possui 3,1Kb (AMTHOR et al., 2007; LEE, 2004; LEE; MCPHERRON, 2001; MANCEAU et al., 2007; MIURA et al., 2006; MOSHER et al., 2007; SEILIEZ; SABIN; GABILLARD, 2012; WALSH; CELESTE, 2005). A sequência de aminoácidos no homem e no camundongo é 100% idêntica, com pequenas diferenças nas sequências dos nucleotídeos (LI et al., 2010).

A miostatina é sintetizada como uma proteína precursora de 375 aminoácidos, composta por uma sequência N-terminal curta, a região do pró-peptídeo de 28kDa e uma região C-terminal de 12 kDa. Após clivagem proteolítica do precursor, a miostatina é secretada na circulação como um complexo latente e inativo, um dímero propeptídeo/região C-terminal, unidos por pontes dissulfeto. Este dímero sofrerá clivagem proteolítica pelo Fator morfogenético do osso-1/toloidina (BMP-1/TLD), um membro da família das metaloproteinases. As clivagens originarão um fragmento C-terminal capaz de ativar a cascata de transdução de sinais na célula alvo (ELKINA et al., 2011; LEE, 2004; LEE; MCPHERRON, 2001) (Fig.7).

Figura 7- Processamento pós-traducional da miostatina.

Fonte: Modificado de Huang, Chen e Chen (2011).

Como os membros da família do TGF-beta, a miostatina possui dois tipos de receptores (receptores transmembrana treonina/serina kinase): receptores activina tipo I (ActRI) e tipo IIB (ActRIIB). O receptor ActRI também é conhecido como ALK-4/5. O receptor ActRIIB fosforila e ativa o receptor ActRI, que fosforila as proteínas Smads 2 e 3. Após a fosforilação, estas formam heterodímeros com a CoSmad4. As Smads funcionam como uma chave intracelular, para os mediadores sinalizarem a entrada no núcleo e regular a expressão gênica. Constituem a chamada via canônica da miostatina (ELKINA et al., 2011; LEE, 2004; LEE; MCPHERRON, 2001; SEILIEZ; SABIN; GABILLARD, 2012) (Fig.8).

Figura 8- Vias de sinalização da miostatina (em destaque a via canônica); em azul o ActRI e em rosa o ActRIIB.

Fonte: Modificado de Huang, Chen e Chen (2011).

Estudos em cultura de mioblastos mostraram que a miostatina atua bloqueando as fases G1 e G2 do ciclo celular, regulando proteínas importantes ao ciclo celular, como Cdk2 (ciclina dependente de kinase 2), p21 (inibidor de kinase dependente de ciclina 1A) e Rb (proteína do retinoblastoma), sem alterar o mecanismo de apoptose. Sob ação da miostatina, p21 é superexpresso e inibe a atividade das ciclinas E e A/Cdk2 e causa, consequentemente, a hipofosforilação de proteína Rb. A Rb hipofosforilada sequestra o fator de transcrição E2F,

requerido para a entrada na fase S ciclo celular. A hipofosforilação de Rb faz com que este não potencialize as atividades de MyoD e miogenina durante a miogênese (SCHNEIDER et al., 1994; THOMAS et al., 2000; FALCO; COMES; SIMONE, 2006; CAZZALINI et al., 2010; CIAVARRA et al., 2011; HUANG; CHEN; CHEN, 2011).

Há uma regulação extracelular da atividade da miostatina por inibidores específicos. Um deles é a folistatina, que se liga a miostatina e impede a ligação desta com o receptor. GASP-1 (Fator de crescimento e diferenciação associado à proteína sérica 1), que pertence a família da folistatina, liga-se ao propeptídeo da miostatina e regula a sua atividade, provavelmente controlando a sua clivagem proteolítica. A miostatina também pode ser estocada inativada, na matriz extracelular; para isso liga-se covalentemente a proteína LTBP3 (TGF-beta latente ligado a proteína 3) (ELKINA et al., 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário a expressão da miostatina é restrita aos somitos. Seu mRNA pode ser detectado desde o nono dia pós-coito, em cerca de dois terços dos somitos. Entre o décimo e o décimo primeiro dia pós-coito a expressão parece estar localizada no miótomo (LEE, 2004; LEE; MCPHERRON, 2001). Em estágios mais avançados do desenvolvimento é também possível detectar o mRNA da miostatina, fato que sugere a sua participação em toda a embriogênese. Nos progenitores musculares, em diferenciação, há a expressão do receptor ActRIIB, mas a expressão de Smad7 antagoniza o bloqueio à diferenciação feito pela miostatina (MANCEAU et al., 2007).

Em animais adultos, a miostatina continua a ser expressa quase que exclusivamente na musculatura esquelética; entretanto quantidades residuais foram detectadas também em tecido adiposo (GENTRY et al., 2011; MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997). A expressão no músculo esquelético é disseminada, embora exista variação da expressão em diferentes músculos; observou-se que a miostatina é preferencialmente expressa em músculos compostos por fibras de contração rápida, do que naqueles compostos majoritariamente por fibras de contração lenta (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997; WHITTEMORE et al., 2003). É também expressa na musculatura cardíaca (SHARMA et al., 2001).

Estudos verificaram que a expressão da miostatina estava reduzida em 37% nos indivíduos sedentários que participaram de um programa de treinamento físico intenso. Pode-se concluir que a miostatina responde a carga muscular em alguns casos, mas isso dependerá do tipo de contração, frequência, intensidade e duração do estímulo (ROTH; MARTEL; FERREL, 2003; SAKUMA; WATANABE; SANO, 2000). Estudos sugerem que a miostatina poderia participar também no processo de regeneração muscular, sendo um atraente químico

para os fagócitos e células inflamatórias, além de estimular a proliferação dos fibroblastos e consequente fibrose (CHARGÉ; RUDNICK, 2004; MOYER; WAGNER, 2011).

Três raças de gado, *Belgium Blue*, *Piedmontese* e *Asturiana de los Valles*, apresentam mutações naturais no gene da miostatina e o fenótipo da musculatura dupla. Mutações naturais, como deleções no gene que codifica a porção C-terminal, foram descritas em camundongos e acarretam substancial incremento na massa muscular, resultante do aumento no número (hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) das fibras musculares; o mesmo efeito foi observado em animais *knock-out* para o gene da miostatina. Em cães de corrida, da raça *Whippet*, há também aumento na musculatura e melhora de desempenho nos animais heterozigotos (MOSHER et al., 2007). A mutação no gene da miostatina também foi descrita em humanos e resulta em diminuição de sua síntese e fenótipo semelhante aos camundongos *knock-out* (MANCEAU et al., 2007; OLDHAM et al., 2001; SCHUELKE et al., 2004).

A superexpressão da folistatina, em camundongos transgênicos, tem efeitos mais drásticos no aumento da massa muscular do que o observado em animais *knock-out* para a miostatina. Resultados semelhantes foram constatados naqueles que receberam injeções de anticorpos anti-miostatina. Durante a regeneração muscular a miostatina inibe a atividade das CS e também inibe a proliferação e diferenciação dos mioblastos (HIROKI et al., 2011). Após induzirem danos cardíacos em camundongos, Heineke et al. (2010) detectaram aumento na concentração sérica da miostatina e diminuição da musculatura esquelética. Estes dados apontam a miostatina liberada na circulação sistêmica pelos cardiomiócitos como possível causadora da caquexia em pacientes cardiopatas. Estudos recentes mostraram que a decorina, um membro da pequena família dos genes de proteoglicanos ricos em leucina, aumenta a proliferação e a diferenciação de células miogênicas, *in vitro*, pela supressão da miostatina (MIURA, 2006; ZHANG, 2012). Observou-se níveis elevados da enzima creatinafosfoquinase (CK) em camundongos tratados com pró-peptídeo da miostatina e aumento de 15% na massa muscular. O aumento de CK, após a inibição da miostatina, sugere a participação de vias de sinalização relacionadas ao aumento da síntese protéica (TRENDELENBURG et al., 2009). T-cap, uma proteína sarcomérica ligada a titina, tem a propriedade de ligar-se a miostatina, inibindo sua secreção; mioblastos, quando superexpressam T-cap aumentam sua proliferação (NICHOLAS et al., 2002). Estes resultados sugerem que a miostatina é um agente regulador negativo do crescimento muscular. O alvo principal da miostatina seria sua ação nas CS, com ativação de p21 e o bloqueio da ação de MyoD (pela interação física entre MyoD e Smad-3) e miogenina (BOGDANOVICH, 2002;

BOGDANOVICH et al., 2004; GABILLARD, 2012; GARIKIPATI et al., 2007; HULMI et al., 2008; PATEL; AMTHOR, 2005; SCHUELKE et al., 2004; SEILIEZ; SABIN; ZHANG, T. et al., 2011) (Fig.9).

Figura 9-Atuação da miostina no processo de proliferação e diferenciação das células-satélites (A) e ausência de sua atuação (B).

CKI Cyclin kinase inhibitor; Cdk2 cyclin dependent kinase 2; P phosphorylated state; PP hyperphosphorylated state; MRFs myogenic regulatory factors. Upward arrows positive regulation; downward arrows negative regulation.

Fonte: Modificado de Bogdanovich et al. (2004).

Além dos efeitos na musculatura esquelética, a miostatina possui ações no metabolismo lipídico e no desenvolvimento da fibrose. Camundongos *knock-out* para miostatina apresentam aumento na atividade do AMP-ativado por proteína kinase (AMPK), que levará a melhora na oxidação dos ácidos graxos e diminuição do estoque lipídico, coerente com a redução do acúmulo de gordura e da resistência à insulina observada nestes animais (ZHANG, C. et al., 2011).

Muitos estudos enfatizam a inibição da miostatina como uma possível terapia para as doenças musculares, pois o seu bloqueio ativaria a divisão celular e, portanto, a regeneração em modelos distróficos (BOGDANOVICH et al., 2002).

Camundongos DMD^{mdx} tratados com anticorpo anti-miostatina apresentam redução na fibrose do diafragma; animais *knock-out* para miostatina também apresentaram diminuição na fibrose, após lesão muscular aguda (LI; KOLLIAS; WAGNER, 2008). Na ausência da miostatina observou-se aumento na diferenciação das células mesenquimais, derivadas da medula óssea. Este aumento na diferenciação tem impacto no osso, com aumento da sua densidade e resistência (GREEN; HAMRICK; RICHMOND, 2011).

Lee (2005) descreveu um potente inibidor da miostatina (ACVR2B), que quando injetado em camundongo causa aumento de massa muscular. Parson et al. (2006) compararam a inibição da miostatina com anticorpos monoclonais em estágios iniciais e mais tardios nos camundongos nulos para delta-sarcoglicana. Nos estágios iniciais houve melhora na regeneração e redução na fibrose. Em estágios mais tardios não houve melhora na doença. Os resultados sugerem que a inibição da miostatina na doença severa e/ou em estágios mais tardios pode ser ineficaz. Haidet et al. (2008) testaram a injeção intramuscular pós-natal de vírus adeno-associado (AAV), codificando proteínas que inibem a miostatina. Em camundongos selvagens ocorreu o aumento da musculatura e da força. Em camundongos DMD^{mdx} o tratamento melhorou a força, mesmo quando administrada a animais de 6 meses. Whittemore et al. (2003) observaram aumento na força e na massa muscular em camundongos C57BL/6 e BALB/c tratados com anticorpos anti-miostatina, sem alterações em órgãos e tecidos. Camundongos deficientes para a miostatina apresentam aumento da musculatura, porém a força muscular é menor quando comparados a camundongos selvagens (AMTHOR et al., 2007). Li et al. (2010) observaram que o propeptídeo selvagem e suíno mutado bloquearam fortemente a atividade da miostatina em células A204; a administração do propeptídeo mutado em camundongos recém-nascidos aumentou, significativamente, a massa muscular. A imunização de fêmeas de camundongo com miostatina sintética, antes do

acasalamento, resultou na indução da produção de anticorpos anti-miostatina, que melhorou o desenvolvimento corpóreo da prole, com diminuição na gordura e aumento na musculatura (ZHANG, T. et al., 2011).

1.6 Os Fatores morfogenéticos do osso (BMP)

Os Fatores morfogenéticos do osso (BMP-2 a 15) são polipeptídeos associados à matriz extracelular glicosilada e pertencem à família do TGF-beta, como a miostatina. BMP-4, também chamado de BMP-2B, é expresso em músculo esquelético, pulmão e osso, sendo atualmente muito estudado nas doenças musculares. Os BMP são classicamente conhecidos por induzir o desenvolvimento dos membros, a produção de cartilagem e o crescimento do osso endocondral. Participam também da consolidação das fraturas, pela indução da osteogênese e osteoindução. É também atribuído aos BMP a formação de osso ectópico em roedores. (BUBNOFF; CHO, 2001; KRAUSE; GUSZMAN; KNAUS, 2011; TAKEMOTO et al., 2010; WALSH et al., 2010).

São secretados como uma molécula precursora, com um peptídeo sinal latente na porção N-terminal, que é clivado por proteases. Após a clivagem os BMP tornam-se ativos, capazes de ligarem-se aos receptores. Como membro da família TGF-beta, os BMP possuem dois receptores: o transmembrana do tipo 1 (BMPR-1) e 2 (BMPR-2); porém o BMP-4, por exemplo, pode ligar-se também ao receptor ActRIIB da miostatina, competindo com esta, portanto. A ligação ao BMPR-2 fosforila e ativa o BMPR-1, que fosforila as proteínas Smads 1, 5 e 8. Após a fosforilação as Smads 5 e 8 são liberadas e a Smad 1 forma um heterodímero com a CoSmad4. O heterodímero adentra o núcleo e regula a expressão de genes alvos, como os Inibidores de diferenciação (Ids-1 a 4).

Os Ids são membros da família protéica HLH (*helix-loop-helix*) e o Id-1 é considerado o mais importante inibidor de diferenciação, além de possuir propriedades antiapoptóticas. Os Ids-1, 2 e 3 estão presentes em todas as etapas da vida do indivíduo, enquanto o Id-4 está presente apenas na embriogênese. A inibição da diferenciação ocorre pela ligação das proteínas Id com a Proteína E, de forma ubiquitiosa, para formar um heterodímero, impedindo assim a ligação desta com o MyoD e miogenina, uma etapa necessária para que os fatores de transcrição miogênica sejam funcionais. Esta é a chamada via canônica dos BMP (BUBNOFF; CHO, 2001; ONO et al., 2010; SHIN et al., 2010; WALSH et al., 2010; WONG et al., 2004; XU et al., 2009) (Fig. 10).

Figura 10- A via do BMP.

Fonte: Modificado de Margoni, Fotis e Papavassiliou (2012).

Fisiologicamente a sinalização dos BMP pode ser antagonizada. O antagonismo intracelular é feito, por exemplo, pela Smad7, enquanto o extracelular é feito por Noggin, uma glicoproteína homodimérica codificada pelo gene NOG. Injeções de cDNA de Noggin em embrião de *Xenopus* causa aumento do desenvolvimento da cabeça, justificando o nome Noggin (caneca pequena). É considerado o mais importante regulador da atividade dos BMP. Ono et al. (2010) estudando a regeneração muscular observou que as CS que apresentam expressão aumentada de Noggin diferenciam-se, enquanto CS *knockdown* para o gene NOG melhoram sua proliferação, mas não se diferenciam (ONO, 2010).

Os BMP inibem a diferenciação miogênica para prevenir a miogênese ectópica na placa lateral da mesoderme. No dermatomiótomo os BMP sinalizam a sua própria inibição, a fim de possibilitar o início da miogênese, pois baixos níveis dos BMP possibilitam a ativação da expressão de MyoD e Myf5 pelas células Pax3 positivas. Impedem a diferenciação em linhagens miogênicas imortalizadas e em células miogênicas primárias *in vitro*. Algumas células miogênicas primárias mantêm a expressão de proteínas associadas com miogênese (Pax-7 e MyoD, por exemplo) após a exposição aos BMP por vários dias (ONO et al., 2010).

Durante a regeneração muscular as células-satélites (CS) expressam grandes quantidades de BMPR-1A, com Smad 1/5/8 fosforilada e Smad4 presente no núcleo, indicando sinalização operacional de BMP-4. BMP-4 exógeno mantém as CS em divisão e reduz a diferenciação. Ono et al. (2010) administraram dorsomorfina, um antagonista da sinalização de BMP, em camundongos com dano no músculo gastrocnêmio, induzido por

cardiotoxina, e utilizaram o membro contralateral como controle. A administração da dorsomorfina resultou em diminuição de aproximadamente 20% no diâmetro das fibras centronucleadas, quando comparadas ao controle, enquanto a redução no diâmetro foi próxima de 40% nos animais tratados com o receptor solúvel dos BMP (sBMPR-1Af). Também houve aumento significativo da deposição do colágeno tipo 1, com os dois tratamentos, e os autores concluíram que o bloqueio da via do BMP dificulta a regeneração muscular após lesão.

Na figura 11 temos um resumo das expressões do receptor do BMP (BMPR-1A), Smad1/5/8, Id-1 e Noggin e da influência de BMP-4 nas diferentes etapas da regeneração muscular.

Figura 11- Progressão da sinalização do BMP-4 durante a regeneração muscular e a influência desta sobre as células satélites.

Fonte: Ono et al. (2010)

1.7 As interações entre a Miostatina, BMP, genes da cascata de regeneração e destes com outras vias de sinalização

A via de ação da miostatina é convencionalmente chamada de TGF-beta/Activina e a dos BMP de BMP-Smad, porém ambas são subdivisões da via do TGF-beta e interagem entre si. Investigações mostraram que o antagonismo entre BMP-Smad e TGF-beta/Activina pode ser explicado pela competição intracelular pela Smad4, quando as duas vias são ativadas simultaneamente. A Smad6 (inibitória) compete com a Smad4 pela Smad1, para formar o dímero inativo Smad1/6; porém a Smad6 não compete pela Smad2 antagonizando, portanto, a

via do BMP-Smad. O antagonismo da miostatina à via do BMP-Smad terá um efeito inibitório indireto na chamada via do JAK-STAT (sinais transdutores e ativadores de transcrição), via que participa da diferenciação dos astrócitos e que induz o aumento na produção de receptores de andrógeno (RA) na musculatura esquelética (BUBNOFF; CHO, 2001; KLOVER et al., 2009; WAGNER; SCHMIDT, 2011) (Fig.12).

A via do ERK-MAPK possui uma relação com as vias da miostatina e dos BMP, a partir de mecanismos distintos. O antagonismo da via dos BMP ocorre pela fosforilação de Smad1 por ERK. A consequência desta fosforilação é o acúmulo intranuclear de Smad1 e impossibilidade da formação do complexo Smad1/5/8, fundamental para as atividades dos BMP. Já o antagonismo da via da miostatina ocorre de maneira indireta, pois ERK fosforila a calmodulina (via não-canônica do Wnt), e esta fosforilada inibe a atividade de Smad2 (BUBNOFF; CHO, 2001) (Fig.12).

A família do Wnt (*Wingless and Int*) é fortemente relacionada com o desenvolvimento e regeneração muscular. Consiste em 19 glicoproteínas secretadas como lipídios modificados, dividida em duas categorias, baseada em seu papel na estabilização citosólica da beta-catenina: canônica e não canônica. A via não canônica caracteriza-se por não depender da beta-catenina e transduzir o sinal a partir de numerosas sinalizações, como a Wnt/cálcio/calmodulina (BERNARDI et al., 2011; DU et al., 2011). Estudos recentes utilizando células C2C12 demonstraram que durante a proliferação, estas células expressam pouco Wnt-4, porém esta expressão aumenta fortemente durante a diferenciação. Os Wnts (especialmente o Wnt-4), pela via não canônica, antagonizam a via do TGF-beta/Activina, diminuindo com isso a sinalização da miostatina, por exemplo, no processo de hipertrofia (BERNARDI et al., 2011; MARGONI; FOTIS; PAPAVALASSILIOU, 2012).

Figura 12 –Relação entre as vias do TGF-beta/Activina (miostatina) e BMP-Smad (BMP-4) com as de sinalização de ERK-MAPK, Wnt e JAK-STAT.

Fonte: Modificado de Margoni, Fotis e Papavassiliou (2012).

O Fator de crescimento semelhante à insulina, tipo 1 (IGF-1), via Akt, induz hipertrofia muscular pelo aumento na síntese protéica modulada via Akt/alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Há dois complexos distintos do mTOR, chamados de TORC1 e TORC2. TORC1 inclui a proteína chamada RAPTOR (proteína regulatória associada com mTOR), e pode ser inibido pela rapamicina. Em TORC2 o mTOR forma um complexo com uma proteína chamada RICTOR (companheiro do mTOR insensível a rapamicina). Ambos os complexos podem ter sua ativação inibida pela miostatina, a partir do bloqueio de Akt. O bloqueio de TORC1 inibe a síntese protéica, enquanto o bloqueio de TORC2 impediria que FoxO (*Forkhead Box O*) fosse fosforilado. FoxO não fosforilado tem a capacidade de translocar-se para o núcleo e liberar as chamadas “vias da atrofia”: aumento da expressão de E3 ubiquitina ligase do anel muscular 1 (MuRF1) e do Box F da atrofia muscular (MAFbx), também conhecido como atrogina-1 (Fig-13) (ELKINA et al., 2011; TRENDELENBURG et al., 2009; WU et al., 2010).

Existe também uma relação entre miostatina, ciclina D1 (importante componente da fase G1 do ciclo celular) e Akt. Sabe-se que células tratadas com miostatina apresentam um declínio nos níveis de ciclina D1. Este declínio é explicado por uma reação em cadeia: a miostatina causa a desfosforilação de Akt, que nestas condições torna-se ativada. Akt ativada

é de 25 a 125 vezes maior no testículo (340-2000 nM), quando comparado aos níveis séricos (8,7-35 nM). Resultados similares foram encontrados em testículos de ratos (WALKER, 2010).

O LH age nas células intersticiais testiculares e causa o aumento na produção do 3'-5'-monofosfato de adenosina (AMP cíclico), que induz o aumento da conversão do colesterol em androgênios. Os principais efeitos do FSH são relacionados à espermatogênese, mas ele possui outros efeitos nos testículos, como o crescimento testicular, por aumentar a síntese de testosterona e LH. A testosterona tem ações sobre a hipófise anterior e o hipotálamo, ocasionando a inibição da liberação (*feedback* negativo), respectivamente, do LH/FSH e GnRH (HIORT, 2002).

No organismo a testosterona pode originar quatro metabólitos, sendo os mais importantes, a diidrotestosterona, resultante da ação da isoenzima 5 α -redutase, e o estradiol, com efeitos feminilizantes, pela ação da aromatase (HIORT, 2002; ZHU, 2005; KICMAN, 2008).

Em muitos tecidos alvos de androgênios, como a próstata, a diidrotestosterona é mais ativa que a testosterona. Sabe-se que a diidrotestosterona liga-se ao receptor de andrógeno (RA) dez vezes mais fortemente que a testosterona, formando um complexo com o receptor muito estável. O efeito final dos andrógenos é a somatória das ações da testosterona, da diidrotestosterona e do estradiol (KICMAN, 2008; WILSON, 1996).

Nos meninos a testosterona começa a ser sintetizada na vigésima semana de vida fetal, inicialmente na crista genital. Entre dois e três meses de gestação há a descida dos testículos fetais para a bolsa escrotal. Os testículos, agora na bolsa escrotal, passam a produzir quantidades razoáveis de testosterona. A testosterona participará da formação do pênis, escroto, próstata e vesículas seminais e inibirá a formação dos órgãos femininos (HIORT, 2002, KICMAN, 2008). Na puberdade será responsável pelo surgimento dos caracteres sexuais secundários masculinos, como o desenvolvimento do pênis, escroto e testículos. Estimula o crescimento dos pelos, a mudança do timbre de voz (voz grave) e o desenvolvimento da musculatura (50% maior nos homens, quando comparados às mulheres) (GUYTON, 2006; HIORT, 2002; PALVIMO, 2012). Na fase adulta os testículos produzem, aproximadamente, de 6 a 7 mg de testosterona/dia, e serão responsáveis pela manutenção dos caracteres sexuais adquiridos durante a puberdade. Após os sessenta anos a produção de testosterona reduz-se a metade, o mesmo ocorrendo com a espermatogênese (GUYTON, 2006).

1.8.2 Receptor de andrógeno

O receptor de andrógeno (RA) localiza-se no citoplasma das células responsivas aos andrógenos: células musculares, testiculares, queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e linfócito B. O RA, membro da superfamília dos receptores nucleares, é codificado por um gene localizado no cromossomo Xq 11-12, formado por oito exons e sete introns (SATO; KAWANO; KATO, 2002; YOUNG; LOY; SIM, 2003; ZHU, 2005; GAO et al., 2005; GAO; BOHL; DALLON, 2007, PALVIMO, 2012, TORALDO et al., 2012).

Na ausência de andrógenos o RA estará associado a proteínas de choque térmico (HSP) no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo celular. A ligação dos andrógenos ao RA desfaz a associação RA-HSP e há o surgimento dos homodímeros, que se dirigem ao núcleo e ligam-se aos chamados elementos responsivos a andrógenos (ARE) (FELDMAN; FELDMAN, 2001; GAO et al., 2005; GAO; BOHL; DALLON, 2007; MATSUMOTO et al., 2005; WALKER, 2010; YOUNG; LOY; SIM, 2003; ZHU, 2005). Esta via clássica de ação da testosterona requer de 30 a 45 minutos para alterar a expressão gênica e algumas horas para alterar a produção protéica (WALKER, 2010) (Fig.14).

Figura 14- Função do receptor de andrógeno na regulação da transcrição.

Heat-shock proteins (HSPs). Co-ativadores (such as ARA70). General transcription apparatus (GTA).
Fonte: Modificado de Feldman; Feldman (2002).

Estudos em células de Sertoli e outros tipos celulares confirmaram que a testosterona pode agir por mecanismos não clássicos e alterar a expressão de genes não dependentes dos ARE ou das interações com o receptor de andrógeno. A testosterona pode estimular e despolarizar a célula de Sertoli e causar o influxo de cálcio, além de poder ativar uma série de quinases da via do MAPK-ERK. ERK ativado atua sobre o ciclo celular e propicia a proliferação celular (CHAMBARD et al., 2006; WALKER, 2010). Além de MAPK-ERK outras vias podem ser usadas pela testosterona, como a do Notch, Akt e Wnt (WU et al., 2010).

1.8.3 Esteróides anabolizantes

Os esteróides anabolizantes são substâncias originadas de mudanças químicas, feitas em laboratório, na molécula da testosterona naturalmente sintetizada, com o intuito de melhorar as propriedades farmacológicas desta. Entende-se por anabolismo um estado onde o nitrogênio é retido na massa magra, seja pelo aumento na síntese protéica e/ou diminuição na sua perda (KUHN, 2002). Os esteróides da classe I são chamados de ésteres da testosterona e são representados pelo cipionato, proprionato, enantato e undecanoato de testosterona. São mais solúveis em gordura e, por isso, sua absorção pela circulação é retardada. Seus efeitos androgênicos e anabólicos são semelhantes. Os derivados da nortestosterona, representados pelo decanoato e fenpropionato de nandrolona, são os esteróides da classe II. Caracterizam-se pela baixa velocidade de metabolização, forte afinidade pelo RA, pequena conversão em estradiol ou em outros esteróides com baixa afinidade pelo RA. Há o consenso na literatura de que os esteróides da classe II tem maior efeito anabólico do que androgênico, ou seja, aumentam a massa muscular sem gerar, comumente, a virilização.

O decanoato de nandrolona (DN) possui genes alvos diferentes da testosterona, fato observado por Wu et al. (2012) quando submeteram ratos com lesão em medula óssea a tratamentos com testosterona e/ou DN, onde o tratamento com ambos levou a redução na expressão de Smad2/3, receptor de Activina II (ActRII) e folistatina, enquanto o tratamento isolado com testosterona não levou a mudanças na expressão dos genes citados anteriormente; estes dados indicam uma diminuição da atividade da miostatina com o uso do DN, pois a mesma estaria incapacitada de ligar-se ao seu receptor. Além disso, o DN diminui a expressão dos chamados “genes de atrofia”: MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*), MuRF1 (*Muscle RING-finger protein-1*) e FoxO (*Forkhead box O*) (WU et al., 2012). Outra propriedade do DN é

adentrar o músculo sem a necessidade de ser convertido em 5 α -diidro-19-nortestosterona. Os fatos citados justificam o efeito anabólico de quatro a 10 vezes maior do que seus efeitos virilizantes, quando comparado à testosterona (DEMLING, 2007; KICMAN, 2008).

1.9 Os andrógenos/esteróides e o músculo esquelético: aumento na síntese protéica, células-satélite e miostatina

O músculo esquelético é o maior alvo da ação anabólica dos andrógenos/esteróides, que participam do desenvolvimento muscular normal, homeostase e adaptação (LEE et al., 2011). Vários mecanismos estão associados ao papel da testosterona como causa de hipertrofia das fibras musculares, incluindo o estímulo à síntese (aumento da atividade de mTOR) e a ativação de células satélites (GRUENEWALD; MATSUMOTO, 2003; RECKELHOFF et al., 2005; DEMLING, 2007; KERR; CONGENI, 2007; KADI, 2008; WU et al., 2010). Outros fatores que também contribuem para os efeitos anabólicos da testosterona são: estímulos à síntese hepática do Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e à secreção do Hormônio de crescimento (GH) (KUHN, 2002).

Estudos realizados em atletas levantadores de peso mostraram que doses semanais entre 100 e 500 mg de testosterona, durante cerca de nove anos, causaram hipertrofia das fibras do tipo I e II nos músculos trapézio e vasto lateral. Doses de 300 e 600 mg de testosterona induziram aumento na área de secção transversa das fibras tipo I, enquanto apenas na dose de 600 mg foi observado aumento nas fibras tipo II, sugerindo que as fibras do tipo I são mais sensíveis aos esteróides do que as do tipo II (KADI, 2008). Experimentos em ratos recebendo oxendolona, um bloqueador do receptor de andrógeno, inibiu a hipertrofia nas fibras musculares destes animais, demonstrando a importância do RA no processo de hipertrofia (INOUE et al., 1994). Estudos demonstraram o aumento do número de RA na fibra muscular, após um mês de tratamento com testosterona. Com seis meses de tratamento o número RA é o mesmo de um indivíduo não tratado (KADI, 2008).

A fibra muscular de um homem adulto possui cerca de 100 mionúcleos, onde cada mionúcleo sustenta a síntese protéica de um volume finito do citoplasma, conceitualmente chamado de domínio nuclear (CHEEK, 1985). Aumentos a partir de 36% na área de secção transversa são acompanhados de acréscimo significativo no número de mionúcleos na fibra. Os esteróides promovem aumento no número de mionúcleos. Levantadores de peso de alto

nível, usuários de esteróides anabolizantes, possuem um número de mionúcleos maior quando comparados aos atletas não usuários destas substâncias (KADI, 2008).

Hormônios esteróides, como o enantoato de testosterona, foram utilizados em homens saudáveis, em diferentes doses suprafisiológicas, na forma de injeções intramusculares. Observou-se um aumento no número de células satélites (CS) no músculo esquelético, mas o mecanismo pelo qual ocorreu este aumento não ficou claro (GRUENEWALD; MATSUMOTO, 2003). Sugeriu-se que o aumento nas CS poderia ser consequência da diminuição na apoptose ou resultante do aumento da proliferação das CS, mediado pelo aumento de receptores de andrógenos (RA), conforme observado previamente em cultura de CS suínas, quando expostas a testosterona (HIKIM et al., 2003). Estudos posteriores, analisando a ação dos esteróides sobre as CS em músculo sóleo de ratos, mostraram aumento no número de fibras musculares, no número de fibras com núcleo centralizado e aumento de expressão da ciclina DI após três dias de administração do decanoato de nandrolona (DN). Estes resultados sugerem que o DN pode aumentar a massa muscular (MCCLUNG et al., 2005). Já no estudo realizado nos levantadores de peso (KADI, 2008), o número de CS nos indivíduos que utilizaram esteróide foi maior do que em indivíduos saudáveis não treinados, porém semelhante aos levantadores de peso não usuários de esteróide. Uma das hipóteses sugeridas é que o tempo de uso dos esteróides influenciaria a atividade das CS: o uso por um curto período favoreceria a geração de CS que escapariam da diferenciação e retornariam ao estado quiescente, enquanto o uso prolongado favoreceria a diferenciação destas células em mioblastos (KADI, 2008).

O aumento da massa muscular observado após administração de testosterona é acompanhada pela diminuição da gordura corpórea, fato verificado em muitos casos de obesidade relacionados à insensibilidade androgênica, secundária a interrupção da sinalização do RA (DUBOIS et al., 2012). Experimentos utilizando linhagens de células mesenquimais pluripotentes C3H10T1/2 demonstraram que, quando tratadas com testosterona, estas células apresentaram superexpressão de marcadores de diferenciação miogênica e diminuição na expressão dos marcadores de diferenciação adipogênica. Estes fatos sugerem que a testosterona tem efeitos sobre a composição corpórea via RA e importante papel na regulação da diferenciação das células precursoras, com participação da via do Wnt (SINGH et al., 2003).

A hipertrofia observada em camundongos *knockout* para miostatina é mais pronunciada em machos comparados com fêmeas e a superexpressão da miostatina mostra o

contrário, ou seja, os machos tem menor perda de massa muscular comparado às fêmeas (DUBOIS et al., 2011). Para verificar a relação entre crescimento muscular, testosterona e expressão da miostatina Mendler et al. (2007) utilizaram ratos adultos castrados. Nos animais que não receberam suplementação de testosterona observou-se aumento na expressão do RNAm para a miostatina e atrofia do músculo levantador do ânus. O contrário se observou nos animais que receberam a testosterona, ou seja, a musculatura não sofreu atrofia e houve redução na expressão do RNAm da miostatina. Resultados semelhantes aos obtidos para o RNAm foram observados quando mensurou-se a quantidade de miostatina presente no músculo. **Portanto, a testosterona pode ter um papel importante no crescimento muscular, pela regulação negativa da expressão da miostatina.** Diel et al. (2008) observaram que os andrógenos e esteróides anabolizantes estimulam a proliferação de C2C12, aceleram o processo de diferenciação para miotubo e estimulam a expressão da miostatina em células diferenciadas e indiferenciadas.

A interação andrógeno/miostatina não se restringe apenas a expressão do gene da miostatina, mas também a algumas vias de sinalização. Os andrógenos aumentam a sinalização da beta-catenina, aumentando a expressão de genes alvo como a folistatina, que resultará em inibição da atividade da miostatina (SINGH et al., 2009). Ratos castrados suplementados com testosterona apresentam inibição da axina, um inibidor da beta-catenina, demonstrando a interação testosterona/beta-catenina/miostatina (DUBOIS et al., 2011). Observou-se também, sob a ação da testosterona, maior expressão do gene da ornitina decarboxilase, devido ao aumento na expressão do receptor de andrógeno, com consequente estímulo à proliferação/diferenciação em células C2C12 e mioblastos humanos (LEE et al., 2011).

1.10 Antiandrógenos

São compostos utilizados com a finalidade de bloquear a ação dos androgênios testiculares e adrenais nas células prostáticas, como forma alternativa de supressão endócrina (KAN et al., 2008; MARONA; STORTI; NETO, 2004). Os antiandrógenos podem ser divididos em dois grupos, esteroidais e não-esteroidais.

Os antiandrógenos esteroidais, como o acetato de ciproterona, são fármacos que não apenas competem com a testosterona e a diidrotestosterona pela ligação aos receptores andrógenos, mas também exercem ação semelhante a da progesterona, inibindo parcialmente

a liberação hipofisária de hormônio luteinizante e a produção de testosterona (MARONA; STORTI; NETO, 2004).

A Flutamida é um antiandrógeno não-esteróide, destituído de atividade hormonal, utilizado no tratamento do câncer avançado de próstata, como monoterapia ou em combinação com outros agentes. Estudos demonstraram que a Flutamida diminui o tempo de cicatrização de feridas em ratos, podendo ser usada no tratamento de queimaduras. A Flutamida e seus metabólitos, principalmente a 2-hidróxi-flutamida, atuam inibindo a ligação da testosterona ou da diidrotestosterona aos receptores nucleares e citoplasmáticos nas células-alvo (MARONA; STORTI; NETO, 2004; TORALDO, 2012).

1.11 As doenças neuromusculares

1.11.1 As distrofias musculares progressivas

As distrofias musculares progressivas constituem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Mutações em vários genes resultam na deficiência ou perda de função de diversas proteínas musculares de importância significativa para o bom funcionamento do músculo. Estudos bioquímicos e imunohistológicos tem localizado estas proteínas no sarcolema (distrofina, alfa, beta, gama e delta sarcoglicanas, disferlina e caveolina 3), na matriz extracelular (laminina-2 e colágeno VI), nos sarcômeros (teletonina, miotilina, titina, actina e tropomiosina), no citosol (calpaína 3, FKRP, TRIM32, miotubularina) e nos núcleos (emerina, lamina A/C, proteína SMN) (VAINZOF et al., 2003).

O Complexo distrofina glicoproteínas associadas (CDGA) é um complexo oligomérico, formado pelos subcomplexos distroglicano (alfa e beta distroglicana-DG), sarcoglicano (alfa, beta, gama e delta sarcoglicanas-SG), sintrofinas, e distrobrevinas. A associação da distrofina ao complexo CDGA é feita através de sua ligação à proteína alfa-DG. A proteína alfa-DG está associada ao complexo transmembranoso sarcoglicano, e também à proteína periférica de membrana alfa-DG. Desta forma, o CDGA promove a ligação entre as proteínas internas da fibra muscular (ligação actina-distrofina), e a matriz extracelular (associação alfa-DG-laminina 2). A laminina 2 é composta por três cadeias, sendo uma delas a cadeia 2 (BARRESI, 2011; ERVASTI; CAMPBELL, 1993; OZAWA et al., 1995) (Fig.15).

Figura 15- O Complexo distrofina glicoproteínas associadas (CDGA).

Fonte: Barresi (2011).

A ausência de distrofina na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) resulta na deficiência secundária dos componentes do CDGA. Como consequência ocorre à instabilidade desse complexo, e as fibras musculares tornam-se mais susceptíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular. O estresse mecânico leva ao processo de degeneração em pacientes com esta forma de distrofia muscular. Portanto, as proteínas do complexo CDGA também são de extrema importância para o bom funcionamento do músculo, e assim como a deficiência de distrofina causa a DMD, alterações nas proteínas do complexo CDGA causam as distrofias musculares do tipo Cinturas (DMC). As formas autossômicas recessivas mais graves, e de início mais precoce, são as sarcoglicanopatias, causadas por mutações nos genes que codificam as quatro proteínas sarcoglicanas (alfa, beta, gama e delta SG). As formas de distrofias das Cinturas mais benignas são a DMC2A, DMC2B e DMC2G, causadas pela deficiência da enzima calpaína 3, da proteína sarcolemal disferlina e da proteína sarcomérica teletonina, respectivamente. Além disso, mutações no

gene LAMA2, que codifica a cadeia 2 da laminina muscular (laminina-2), causam uma forma de distrofia muscular congênita muito grave, CMD1A. (ERVASTI; CAMPBELL, 1993).

Por outro lado, novas formas de distrofias musculares foram recentemente associadas a mutações em genes que codificam enzimas glicosiltransferases, que contribuem para a glicosilação da proteína alfa-DG. Curiosamente, a análise de proteínas em biópsias musculares destes pacientes mostra uma hipoglicosilação da alfa-DG e redução significativa de numerosos ligantes da matriz extracelular. Uma das formas de distrofia muscular congênita, forma MDC1D, foi associada a mutações no gene *LARGE*, que recebe este nome por possuir 660Kb do DNA genômico. Este gene está envolvido na glicosilação da proteína alfa-DG, membro essencial na formação e funcionamento do complexo CDGA. Portanto, o estudo da via de glicosilação de proteínas musculares se tornou muito importante na compreensão de novos mecanismos causadores de doenças neuromusculares humanas (GREWAL; HEWITT, 2002, 2003; MUNTONI, 2003; MUNTONI; VOIT, 2004).

1.11.2 Modelos murinos para distrofias musculares

Muitos animais apresentam naturalmente fenótipos relacionados com características já observadas em doenças hereditárias, enquanto outros são modificados geneticamente. Os modelos murinos são os mais estudados e utilizados para as distrofias musculares. Estes animais geralmente apresentam alterações fisiológicas relatadas em pacientes humanos. Servem como ferramentas para estudos genéticos, clínicos, histopatológicos e terapêuticos, ajudando na compreensão da origem das doenças e suas manifestações nos indivíduos afetados (VAINZOF et al., 2008).

Um modelo murino importante para o estudo de defeito de glicosilação da alfa-distroglicana é camundongo *Large^{myd}*, que surgiu de uma mutação espontânea no *background* C57BL, com herança autossômica recessiva. Esta mutação é uma deleção, superior a 100 kb, que engloba os exons de 4 a 7 do gene *LARGE*, localizado no cromossomo 8 e 22 no camundongo e em humanos, respectivamente. O RNAm resultante da deleção possui um códon de terminação prematuro, anterior ao primeiro dos dois domínios catalíticos e leva ao surgimento de uma proteína truncada. O gene *Large* codifica uma possível glicosiltransferase (com 98% de identidade com a sequência dos aminoácidos em humanos) e a deleção resultará em alteração da glicosilação da alfa-DG e consequente desestruturação do CDGA, impossibilitando sua correta ligação aos componentes da matriz extracelular e às proteínas

internas da fibra muscular, o que gera o padrão distrófico (BROWNING et al., 2005; GREWAL et al., 2001; GREWAL; HEWITT, 2002) (Fig.16).

Figura 16- A relação alfa-distroglicana/carboidratos (círculos cinza)/laminina com a integridade do CDGA. Demarcado em verde (à esquerda) a desestruturação do complexo, decorrente a mutação do gene *LARGE* no modelo *Large^{myd}*, à direita o complexo normal.

Fonte: Modificado de Grewal e Hewitt (2002).

Os animais homozigotos podem ser reconhecidos com 12 a 15 dias de vida, pelo seu tamanho reduzido e postura anormal dos membros posteriores. Com seis a oito semanas de idade apresentam cifose em coluna torácica e este quadro piora progressivamente. A fraqueza é significativa, destacando-se o comprometimento dos músculos esqueléticos e cardíaco (GREWAL; HEWITT, 2002; VAINZOF et al.; 2008). Defeitos neuronais aparecem no cérebro principalmente no córtex e cerebelo, também presentes no camundongo deficiente de fukutina (BROWNING et al., 2005). Outros aspectos do fenótipo incluem: diminuição da aptidão reprodutiva, altos níveis séricos de CK e depósito de cálcio no diafragma (GREWAL; HEWITT, 2002).

A histologia muscular dos animais afetados caracteriza-se por miopatia focal, com áreas de necrose aguda e aglomerados de fibras em regeneração e degeneração, fibras com calibres variados, diminuição das estriações e núcleos centralizados (GREWAL; HEWITT, 2002) (Fig.17).

Figura 17- A histologia muscular dos animais *Large^{myd}* (coloração HE, 400x)

Fonte: Vainzof et al. (2008).

2 OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo estudar a relação entre a variação do peso corpóreo sob o efeito dos esteróides anabolizantes e/ou da Flutamida, um antagonista competitivo do receptor de andrógeno, e a expressão da miostatina, visando possíveis abordagens terapêuticas para as distrofias musculares. Para isto foram realizados estudos no músculo normal e distrófico.

Objetivos específicos:

- ✓ determinar os efeitos dos esteróides anabolizantes, e na ausência da ação destes, no peso corpóreo e no diâmetro das fibras musculares;
- ✓ relacionar as alterações no peso corpóreo com a expressão da miostatina, a partir da técnica de PCR em tempo real (Q-PCR);
- ✓ estudar o comportamento de outros genes, como os genes da cascata de regeneração e da via do BMP, que poderiam influenciar na atividade da via da miostatina;
- ✓ avaliar possíveis benefícios funcionais nos animais distróficos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais e manutenção da colônia

Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Estudos do Genoma Humano, em temperatura constante e boas condições sanitárias. Os animais receberam alimentação e água *ad libitum*. Foram utilizados 36 camundongos C57BL/6 (camundongo normal, sendo seis destes *Wild-type* da linhagem *Large^{myd}*), 26 camundongos *Large^{myd}* (GREWAL; HEWITT, 2002), todos do sexo masculino e com três meses de idade.

Os animais foram submetidos aos protocolos dos experimentos 1 e 2, descritos a seguir, pesados e avaliados funcionalmente. A mensuração do peso corpóreo (experimento 1 e 2) e as avaliações funcionais (experimento 2) foram realizadas no primeiro e último dia do experimento, sendo que a última pesagem foi realizada após a eutanásia, feita em câmara de CO₂. Os tecidos foram coletados e processados de acordo, para cada uma das metodologias.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biociências-IB-USP (protocolo 113/2010).

3.2 Genotipagem da linhagem *Large^{myd}*

Os animais da linhagem *Large^{myd}* foram identificados com furos na orelha e fragmentos da cauda foram utilizados para a extração do DNA, utilizando-se solução de extração e proteinase K. As caudas foram incubadas à 55 °C *over night*. Após a incubação o DNA foi precipitado com isopropanol e ressuspendido em 50 µL de TE.

Para a genotipagem utilizou-se uma reação de PCR multiplex, que amplifica os alelos normal e mutado, simultaneamente. Nos indivíduos homozigotos há a amplificação do alelo mutado (421 pb), enquanto nos *Wild-type* há a amplificação apenas do alelo normal (162 pb). No heterozigoto os dois alelos são amplificados. Os oligonucleotídeos utilizados na reação são (BROWNING et al., 2005):

- Mouse wild type *forward* (MWTF): 5'-GGC CGT GTT CCA TAA GTT CAA-3';
- Mouse wild type *reverse* (MWTR): 5'-GGC ATA CGC CTC TGT GAA AAC-3';
- Mutation *forward* (MUTF): 5'-ATC TCA GTC CCA AAG GGT GAA G-3';
- Mutation *reverse* (MUTR): 5'-GCC AAT GTA AAA TGA GGG GAA A-3'.

Os resultados desta reação, realizadas em animais controles, podem ser observados na eletroforese das amostras em gel de agarose 3% (Fig. 18).

Figura 18- Genotipagem dos camundongos *Large^{myd}*. Eletroforese dos produtos de PCR multiplex em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo.

Fonte: Santos (2012).

3.3 Congelamento das amostras musculares

Os músculos gastrocnêmios foram retirados do camundongo imediatamente após a eutanásia. Para a análise histológica todo o gastrocnêmio foi fixado com TissueTek O.C.T. (Qiagen) em blocos de cortiça, de modo que o seu corte apresente a disposição transversal das fibras, envoltos por talco para crioproteção e congelados.

Para a realização dos experimentos de PCR em tempo real (Real-time PCR-QPCR) e Microarranjos de expressão de DNA (*Microarray*) os fragmentos do músculo quadríceps foram diretamente congelados em nitrogênio líquido. Todo o material ficou estocado no nitrogênio líquido até o processamento.

3.4 Preparação das lâminas e a coloração de hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas de vidro foram cobertas com polilisina, para aumentar a aderência do corte histológico à lâmina. Os fragmentos musculares foram seccionados na espessura de 7µm, em

um micrótomo/criostato à temperatura de -25 °C (Microm HM 505E). Em seguida as lâminas foram armazenadas a -70 °C.

Para a coloração de HE as lâminas foram deixadas, aproximadamente, uma hora em temperatura ambiente. Em seguida as mesmas foram mergulhadas em hematoxilina (previamente filtrada), por 10 minutos, e lavadas em água corrente. Após 10 minutos de lavagem as lâminas foram mergulhadas em eosina, por 3 minutos. Após este período foram fixadas em ácido acético, desidratadas e montadas com Bálsamo do Canadá.

Esta coloração permite analisar a morfologia das fibras musculares e dos tecidos adjacentes, permitindo-nos também constatar a presença de regeneração/degeneração, presença e distribuição do tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório, entre outros aspectos.

3.5 Mensuração das fibras musculares

A partir da análise das lâminas coradas em HE e utilizando-se o software *AxioVision Rel.4.8*, fizemos as mensurações das fibras musculares, considerando-se sempre o menor diâmetro na fibra (em μm), localizadas em um campo de aumento de 200x. Foram medidas entre 250 e 300 fibras musculares de cada animal. O diâmetro menor é o parâmetro mais confiável para a mensuração das fibras, uma vez que evita as distorções que poderiam ocorrer caso o músculo não estivesse cortado, perfeitamente, em sua orientação transversal (DUBOWITZ; SEWRY, 2006).

3.6 Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando-se duas metodologias. Uma delas utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme as especificações do fabricante. O RNA foi diluído em 50 μL água classe 1, tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC) (livre de ribonucleases) e armazenado em freezer -70 °C, para posterior utilização na técnica de PCR em tempo real.

A outra metodologia utiliza o *RNeasy Microarray Tissue Mini Kit* (Qiagen), conforme orientações do fabricante. Este método visa purificar o RNA de compostos orgânicos, como o fenol, a fim de possibilitar seu uso para a técnica de microarranjos de expressão de DNA (*Microarray*).

A concentração do RNA foi obtida em espectrofotômetro, no comprimento de onda 260ng, e sua qualidade determinada em gel de agarose 1,5%.

3.7 Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA codificante total (cDNA) utilizou-se 1 µg de RNA total. A esta massa de RNA total acrescentou-se 0,5µg de oligo dT; 1,5 µg de random primer; 1mM de cada dNTP e água DEPC (Invitrogen), para um volume total de 12µL. Incubou-se a mistura durante 5 minutos no termociclador, a 65° C. Após esta primeira incubação adicionou-se os seguintes reagentes: tampão de reação 50 mM de Tris-HC, pH 8,3 / 75 mM de KCl / 3 mM de MgCl₂ (5x First Strand Buffer–Invitrogen), 10 mM de DTT (Invitrogen), 0,25U de inibidor de ribonuclease (Invitrogen). A mistura foi incubada, no termociclador, durante 2 minutos, a 37 °C. Após esta segunda incubação acrescentou-se 50 U/µL de transcriptase reversa (SuperscriptTM II, Invitrogen) e a mistura permaneceu no termociclador, nas seguintes temperaturas: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 50 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi estocado em freezer a -70 °C.

3.8 PCR em tempo real (Real-Time PCR-Q PCR)-quantificação relativa

Selecionamos para os estudos os seguintes genes:

- miostatina e genes da via do BMP (Noggin, BMP-4 e Id-1);
- genes da cascata de regeneração: Myf-5, MyoD e miogenina.

Como gene endógeno utilizamos o GAPDH.

As amostras de cDNA foram aplicadas, em triplicata, na placa de 96 poços (Applied Biosystems). A cada amostra foi adicionado o par de *primer* do gene de interesse e o FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche), em um volume final de 25µL. A corrida das placas foi realizada no termociclador 7500 Fast Real Time-PCR (Applied Biosystems), nos seguintes parâmetros: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Para a quantificação da expressão relativa dos genes foi necessário preparar uma curva-padrão para cada gene (padronização), onde foi calculada a eficiência da reação. É a partir da curva-padrão que determinamos o limiar (*threshold*), valor arbitrário do sinal de fluorescência para que seja possível a determinação do Ct (ciclo onde é medida a

fluorescência em cada reação). O limiar deve estar acima da linha basal de fluorescência e ser também suficientemente baixo, para localizar-se na região de crescimento exponencial de uma curva de amplificação pela PCR. O limiar é a linha cuja intersecção com a curva de amplificação define o Ct para cada reação. No presente estudo os melhores limiares foram identificados pelo software, e estes valores foram utilizados nas análises posteriores. Todos os primers para os genes estudados foram obtidos em consulta no site *Primer Bank* (pga.mgh.harvard.edu/primerbank/) e suas características (como por exemplo, limiar ou *threshold*) e tecidos utilizados em suas padronizações encontram-se no quadro 1.

Quadro 1- Primers utilizados na reação de PCR em tempo real, suas sequências *foward* e *reverse*, tecidos utilizados para padronização e suas características (limiar, slope, R²).

Gene	Sequência Foward	Sequência Reverse	Padronizado em:	Limiar	Slope	R2
GAPDH	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'	5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3'	músculo de C57BL	0,19483040	3,642031	0,996546
Miostatina	5'-AAC CTT CCC AGG ACC AGG AG-3'	5'-CAT CGC AGT CAA GCC CAA AG-3'		0,08961505	3,633197	0,970398
MyoD	5'-TAC AGT GGC GAC TCA GAT GC-3'	5'-TAG TAG GCG GTG TCG TAG CC-3'	pool de músculo	0,08393150	3,987754	0,961179
Myf-5	5'-CTG TCT GGT CCC GAA AGA AC-3'	5'-GAC GTG ATC CGA TCC ACA ATG-3'	de C57BL e mdx	0,10582090	3,203323	0,964212
Miogenina	5'-CAG TAC ATT GAG CGC CTA CAG-3'	5'-GGA CCG AAC TCC AGT GCA T-3'	(neonatos e 2 meses)	0,09099950	3,664526	0,985807
Noggin	5'-GCC AGC ACT ATC TAC ACA TCC-3'	5'-GCG TCT CGT TCA GAT CCT TCT C-3'	cérebro	0,02605600	3,572000	0,977000
BMP-4	5'-ATT CCT GGT AAC CGA ATG CTG-3'	5'-CCG GTC TCA GGT ATC AAA CTA GC-3'	pulmão	0,05672600	3,642031	0,974000
Id1-1	5'-AGG TGA ACG TCC TGC TCT AC-3'	5'-GTC CCG ACT TCA GAC TCC G-3'	rim	0,03364700	3,424000	0,974000

Fonte: Santos (2012).

O Ct para uma curva de amplificação específica depende de dois fatores: número inicial de cópias da amostra (*template*) e eficiência da amplificação pelo sistema da PCR. Em seguida, o programa calcula o ΔCt , que é a diferença entre a média das triplicatas do Ct de um gene alvo e a média das triplicatas do Ct do gene endógeno: $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$. Em seguida, o programa calcula $\Delta\Delta Ct$, que é a diferença entre a média dos ΔCt de uma amostra chamada normalizador, que será a unidade de expressão: $\Delta\Delta Ct \text{ (amostra alvo)} = \text{média } \Delta Ct \text{ (amostra alvo)} - \text{média } \Delta Ct \text{ (amostra normalizadora)}$. O valor final da expressão de cada gene, relativa ao nível de expressão da amostra normalizadora é dada pela expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O software do equipamento mostra os resultados da quantificações das expressões relativas numa escala logarítmica ($\log_{10} 2^{-\Delta\Delta Ct}$), onde cada incremento corresponde a uma

diferença de 10 vezes na quantificação da expressão gênica relativa (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004; ONOFRE-OLIVEIRA et al., 2012).

3.9 Análise por Microarranjos de expressão de DNA (*Microarray*)

Para a técnica de *Microarray* utilizamos um *pool* de RNA de cada grupo, composto de 300 ng de RNA total de cada animal. Foi utilizado um *chip* de expressão para genes murinos (*Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST*), seguindo todas as etapas preconizadas pelo fabricante. O controle de qualidade, após escaneamento dos *chips* de expressão, foi realizado no software GCOS (Affymetrix), segundo orientações do fabricante.

Os valores de expressão dos diferentes genes foram obtidos utilizando o Robust Multi-array Average (RMA), implementado no *Expression Console* (Affymetrix). Com os resultados obtidos desta análise utilizamos o MeV (*Multi Experiment Viewer 4.8.1*), obtendo a lista dos genes diferencialmente expressos (DEGs), considerando, apenas, diferenças iguais ou maiores que ± 2 *fold change*. Os DEGs foram utilizados no IPA (Pathway Ingenuity Analysis; <http://www.ingenuity.com>) e assim obtivemos as vias onde os genes diferencialmente expressos estariam envolvidos. Os parâmetros utilizados no IPA foram: 35 moléculas por via, 25 vias por análise e apenas relações diretas entre os genes.

3.10 Avaliações funcionais

3.10.1 Força-Grip strength

É um método utilizado para quantificar a habilidade dos camundongos de prenderem-se pelas patas dianteiras e traseiras. Esta habilidade de preensão reflete a função motora, uma vez que prender-se requer o uso da musculatura distal (flexores digitais) (BLANCO; ANDERSON; STEWARD, 2007). É considerado também um método de medida direta de força (BLANCO; ANDERSON; STEWARD, 2007).

Os animais foram colocados inicialmente apenas com as patas dianteiras sobre a grade, mantendo-se a pelve levemente elevada, para evitar o contato das patas traseiras com o aparelho, e são puxados pela cauda. Ao serem deslocados os animais tentam se prender às pequenas barras que compõe a grade e o sensor mensurará apenas a maior força de preensão realizada (em Newton). O mesmo procedimento foi realizado nas patas traseiras, no entanto, envolveu-se, individualmente, as patas dianteiras com um pequeno pedaço de fita adesiva,

para evitar que estas se prendessem na grade e interferissem na mensuração da força das patas traseiras. Foram realizadas cinco avaliações sucessivas e apenas os três maiores valores, obtidos na avaliação das patas dianteiras e traseiras foram considerados.

3.10.2 Resistência nos membros anteriores (RMA)

Suspensão dos animais pelas patas dianteiras em uma barra de metal com três milímetros de espessura, para verificar o tempo que os mesmos se conservam fixos a ela. Consiste em três avaliações sucessivas. Evidencia resistência, aprendizagem e equilíbrio (CHIAVEGATTO et al., 2000).

3.10.3 Resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM)

Suspensão dos animais pelos quatro membros em uma barra de metal, para verificar o tempo em que os mesmos se conservam fixos a ela. Consiste também em três avaliações sucessivas. Evidencia resistência, aprendizagem, equilíbrio e capacidade de envolver a barra com a cauda (CHIAVEGATTO et al., 2000).

3.11 Delineamento experimental

3.11.1 Experimento 1- Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo normal

Para este experimento foram utilizados 30 animais, todos da linhagem C57BL/6, machos, com a idade de três meses, divididos em cinco grupos: grupo salina (S), Deca (D), Flutamida (F), Flutamida+Deca (FD) e Flutamida+testosterona endógena (FE). O tratamento para cada grupo foi: S (100µl de solução salina, intraperitonal-IP), D (100 µl de Decadurabolin [Organon], IP, 25mg/mL), F (25mg/Kg de Flutamida [Sigma], diluída em DMSO, IP) (LIN et al., 2011; WU et al. 2009). A periodicidade das injeções foi semanal para os grupos S e D (cinco injeções, sendo que a primeira foi administrada no primeiro dia do experimento); e diária para o grupo F (35 injeções). Os animais dos grupos S, D e F foram pesados semanalmente e eutanasiados ao final da quinta semana. Os animais do grupo FD foram tratados como os dos grupos F e D, respectivamente, e foram eutanasiados ao final da

décima semana. Os animais do grupo FE foram tratados como os animais do grupo F, porém após a suspensão da Flutamida permaneceram 35 dias sem receber nenhuma injeção IP.

Quadro 2- Identificação dos animais e tratamentos realizados-experimento 1.

Identificação	N	Grupo	Tratamento
1-6	6	S	Salina
7-12	6	D	Decadurabolin
13-18	6	F	Flutamida
19-24	6	FD	Flutamida+Decadurabolin
25-30	6	FE	Flutamida+testosterona endógena

Fonte: Santos (2012).

3.11.2 Experimento 2- Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico

Para este experimento foram utilizados 32 animais, machos, com três meses de idade, genotipados (*Wild-type* N=6, *Large^{myd}*, N=26) e divididos em cinco grupos: *Wild-type salin*, LG salina, LG Decadurabolin, LG Flutamida e LG Flutamida+testosterona endógena. Os animais dos grupos *Wild-type* salina e LG salina receberam 100µl de solução salina, IP, e os do grupo LG Decadurabolin receberam 100 µl de Decadurabolin, IP (LIN et al., 2011), semanalmente, num total de cinco injeções (sendo a primeira administrada no primeiro dia do experimento, após as avaliações funcionais). Os animais do grupo LG Flutamida receberam injeções diárias de Flutamida (Sigma) (25mg/Kg, diluída em DMSO, IP) (WU et al., 2009), num total de 35 injeções. O grupo FE foi tratado como o grupo LG Flutamida, porém após suspensão da Flutamida permaneceram 35 dias sem receber nenhuma injeção IP. Os animais foram pesados semanalmente e eutanasiados ao final da quinta semana. O grupo LG não tratado foi constituído por animais afetados, porém sem tratamento ou avaliações funcionais. As avaliações funcionais realizadas foram: resistência nos membros anteriores (RMA), resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM) e *Força-Grip strength* nas patas dianteiras (GD) e traseiras (GT).

Quadro 3- Identificação dos animais e tratamentos realizados-experimento 2.

Animais	Identificação	N	Genotipagem	Grupo	Tratamento
<i>Wild-type</i>	31-36	6	Normal	<i>Wild-type</i> salina	Salina
<i>Large^{myd}</i>	1LG-6LG	6	Afetado	LG Decadurabolin	Decadurabolin
	7LG-12LG	6		LG salina	Salina
	13LG-15LG	3		LG Flutamida	Flutamida
	19LG-24LG	6		LG Flutamida+ testosterona endógena	Flutamida e testosterona endógena
	25LG-29LG	5		LG não tratado	Sem tratamento e avaliações funcionais

Fonte: Santos (2012).

3.12 Análise estatística

Para o peso corpóreo, expressão relativa dos genes e desempenho nas avaliações funcionais foi realizada utilizando-se o *software* Minitab 15, teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%, pois as amostras, nos diferentes grupos, eram pequenas.

As análises relacionadas ao diâmetro das fibras foram feitas também no Minitab 15, utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov e o T-Student, com nível de significância de 5%.

Utilizamos o *software* MeV e sua ferramenta estatística SAM (Significance Analysis for Microarrays) para a análise estatísticas dos experimentos de análise por Microarranjos de expressão de DNA (*Microarray*).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do esteróides anabolizantes no músculo normal

4.1.1 Avaliação do peso corpóreo

Nas tabelas 1 e 2 e figura 19 estão apresentadas as médias do aumento/decréscimo no peso dos grupos avaliados, bem como o desvio-padrão e o nível de significância (p) pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados mostram que os animais que receberam Decadurabolin, tanto diretamente (D) como após a inibição do receptor de andrógeno pela Flutamida (FD) apresentaram aumento no peso significativamente maior do que o grupo controle ($p < 0,05$). Os animais que receberam somente a Flutamida (em lilás), durante 35 dias, não mostraram nenhum crescimento apresentando, portanto, uma variação no peso menor do que a observada nos controles normais ($p < 0,05$). A média do aumento do peso corpóreo nos animais que estiveram sob a ação de testosterona endógena pós-Flutamida (FE) não variou, de forma estatisticamente significativa, quando comparada às do grupo controle (S).

No grupo FD três animais vieram a óbito antes do final do experimento.

Tabela 1- Variação individual do peso corpóreo dos animais normais, após 35 dias, nos diferentes tratamentos realizados.

Tratamento	Identificação	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Aumento/decréscimo do peso (g)
Salina	1	26,00	27,39	1,39
	2	27,50	31,66	4,16
	3	25,70	28,51	2,81
	4	25,50	27,00	1,50
	5	27,18	27,26	0,08
	6	28,00	31,15	3,15
	Mediana	26,59	27,95	2,16
	Média	26,65	28,83	2,18
	Desvio-padrão	1,04	2,06	1,46
Decadurabolin	7	24,21	27,95	3,74
	8	26,00	30,84	4,84
	9	25,30	31,64	6,34
	10	24,36	28,10	3,74
	11	29,57	36,00	6,43
	12	28,91	35,00	6,09
	Mediana	25,65	31,24	5,47
	Média	26,39	31,59	5,20
	Desvio-padrão	2,31	3,38	1,26
Flutamida	13	25,96	27,29	1,33
	14	23,46	24,00	0,54
	15	27,00	27,23	0,23
	16	28,32	28,03	-0,29
	17	22,77	22,93	0,16
	18	24,38	24,10	-0,28
	21	27,37	26,13	-1,24
	23	25,74	26,06	0,32
	24	25,11	25,35	0,24
	25	32,50	30,54	-1,96
	26	29,68	28,64	-1,04
	27	29,30	27,64	-1,66
	28	29,33	27,96	-1,37
	29	25,39	26,42	1,03
	30	27,17	27,02	-0,15
	Mediana	29,32	27,80	-1,21
	Média	26,90	26,62	-0,28
	Desvio-padrão	2,41	1,44	0,98
Flutamida + Decadurabolin	21	26,13	30,45	4,32
	23	26,06	33,15	7,09
	24	25,35	29,71	4,36
	Mediana	26,10	28,76	2,65
	Média	25,85	31,10	5,26
	Desvio-padrão	0,43	1,81	1,58
Flutamida+testosterona endógena	25	30,54	34,08	3,54
	26	28,64	29,35	0,71
	27	27,64	29,54	1,90
	28	27,96	30,25	2,29
	29	26,42	29,09	2,67
	30	27,02	26,10	-0,92
	Mediana	27,80	29,45	2,10
	Média	28,04	29,74	1,70
	Desvio-padrão	1,44	2,57	1,58

Fonte: Santos (2012).

Tabela 2-Média do aumento/decréscimo do peso, desvio-padrão e nível de significância(p) no teste Mann-Whitney, comparando cada grupo experimental/tratamento com o grupo controle (S). Em azul: $p < 0,05$.

Tratamento	Aumento do peso(g)-média	Desvio-padrão	P (grupo salina)
Salina	2,18	1,46	#
Decadurabolin	5,20	1,26	0,0131
Flutamida	-0,28	0,98	0,0255
Flutamida+Decadurabolin	5,26	1,58	0,0282
Flutamida+ testosterona endógena	1,70	1,58	0,6889

Fonte: Santos (2012).

Figura 19- Variação do peso corpóreo nos animais dos grupos controle (S), Deca (D), tratados com Flutamida durante 35 dias (em roxo), FD e FE ($*p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

4.1.2 Mensuração das fibras musculares

Para cada animal foram medidas entre 250-300 fibras, em corte histológico do músculo gastrocnêmico, corado com hematoxilina-eosina (HE). Os resultados da média dos diâmetros, bem como o desvio-padrão e os níveis de significância, pelo teste T-Student, estão apresentados na tabela 3 e na figura 20. Os grupos F (que receberam Flutamida durante 35 dias e foram sacrificados ao final deste período), FD e FE apresentaram médias de diâmetro de fibras menores, e estas diferenças foram estatisticamente significantes quando comparadas à média do grupo controle (S) ($p < 0,05$). A redução no tamanho das fibras foi mais acentuada

no grupo F. Não houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro das fibras do grupo D em relação ao grupo controle (S).

Tabela 3- Média da mensuração do diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio no grupo controle (S) e demais grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Grupo	n	Número de fibras	Média (μm)	Desvio-padrão (μm)	Coefficiente de variação	p
Salina	6	1614	37,734	9,049	23,980	#
Decadurabolin	6	1070	37,449	8,581	22,910	0,4100
Flutamida	6	1792	33,339	7,533	22,590	<0,0010
Flutamida+Decadurabolin	3	827	36,985	7,960	21,520	0,0360
Flutamida+ testosterona endógena	6	1736	35,481	9,695	27,320	<0,0010

Fonte: Santos (2012).

Figura 20–Média da mensuração do diâmetro das fibras musculares e histologias (HE, 200x) no grupo controle (S) e demais grupos experimentais (*= p<0,05).

Fonte: Santos (2012).

4.1.3 Análise das quantificações das expressões relativas dos genes estudados

Os resultados da avaliação da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina, obtidos na análise dos resultados obtidos pelo PCR em tempo real, estão apresentados no quadro 4 e figura 21. Utilizamos como gene endógeno o GAPDH. O animal número 2 do grupo controle (S2) foi escolhido como normalizador, por apresentar valor de quantificação da expressão relativa da miostatina mais próximo da média do seu grupo (S).

O teste não paramétrico de Mann-Whitney mostrou que a quantificação da expressão relativa do gene da miostatina não é estatisticamente diferente entre os grupos, quando comparados com o grupo controle (S), exceto no grupo FE, onde há diminuição significativa na expressão relativa ($p < 0,05$).

Quadro 4- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância do gene da miostatina no grupo controle (S) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,05$.

Gene	Grupo S	QR	Grupo D	QR	Grupo F	QR	Grupo FD	QR	Grupo FE	QR
Miostatina	S1	-0,10837	D7	-0,04726	F13	-0,18875	FD21	0,02137	FE25	-0,95998
	S2	0,00000	D8	-0,14480	F14	-0,54486	FD23	-0,02258	FE26	-1,31821
	S3	-0,31819	D9	0,59303	F15	-0,71946	FD24	-0,16737	FE27	-1,48950
	S4	-0,23300	D10	-0,16587	F16	0,00271			FE28	-1,41966
	S5	-0,10446	D11	0,04004	F17	-0,08098			FE29	-1,71497
	S6	0,16406	D12	-0,06171	F18	-0,04636			FE30	-1,55693
	Média	-0,09999	Média	0,03557	Média	-0,26295	Média	-0,05619	Média	-1,40987
	DP	0,17036	DP	0,28292	DP	0,29799	DP	0,09876	DP	0,25766
	Mediana	-0,10641	Mediana	-0,05449	Mediana	-0,13486	Mediana	-0,02258	Mediana	-1,45458
			P	0,4712	P	0,6889	P	0,6985	P	0,0051

Fonte: Santos (2012).

Figura 21- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina no grupo controle (salina) e nos demais grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

Como não encontramos diferenças na expressão relativa da miostatina nos grupos experimentais, houve a necessidade do estudo de outros genes/vias, que poderiam explicar o aumento ou a redução no peso corpóreo observado nos diversos grupos.

Para tal, foi avaliada a quantificação da expressão relativa dos genes da cascata de regeneração (MyoD, Myf-5 e miogenina), e da via do BMP (Noggin, BMP-4 e Id-1).

Na análise dos genes da via de regeneração, o grupo F (que recebeu Flutamida durante 35 dias e foi sacrificado ao final deste período) apresentou expressão relativa aumentada de MyoD e miogenina, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os grupos que receberam Decadurabolin diretamente ou pós-Flutamida, respectivamente grupos D e FD, ao contrário, apresentaram expressão relativa menor de todos os genes da cascata de regeneração em relação ao controle (S) ($p < 0,05$), só não sendo a diferença estatisticamente significativa no grupo FD, gene MyoD. Nos animais do grupo FE, onde a testosterona endógena atuou durante 35 dias após a suspensão da Flutamida, observamos expressão

aumentada de miogenina e MyoD e diminuída de Myf-5, estatisticamente significante ($p < 0,05$) (Quadro 5 e Fig.22).

Quadro 5- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância dos genes MyoD, Myf-5 e miogenina no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Gene	Grupo	QR	Grupo	QR	Grupo	QR	Grupo	QR	Grupo	QR
MyoD	S1	0,10416	D7	-0,32301	F13	0,72428	FD21	-0,37358	FE25	1,68637
	S2	0,00000	D8	-0,22427	F14	0,59664	FD23	-0,09031	FE26	0,73722
	S3	-0,07225	D9	-0,15353	F15	1,06896	FD24	-0,34408	FE27	0,61561
	S4	-0,12463	D10	-0,34889	F16	0,74565			FE28	0,13426
	S5	0,15924	D11	-0,49971	F17	0,70110			FE29	-0,00482
	S6	-0,01114	D12	-0,38381	F18	0,74415			FE30	0,87178
	Média	0,00923	Média	-0,32220	Média	0,76346	Média	-0,26932	Média	0,67340
	DP	0,10637	DP	0,12171	DP	0,15954	DP	0,15573	DP	0,60391
	Mediana	-0,00557	Mediana	-0,33595	Mediana	0,73421	Mediana	-0,34408	Mediana	0,67641
			P	0,0051	P	0,0051	P	0,0528	P	0,0450
Myf-5	S1	0,31729	D7	-0,22788	F13	0,75438	FD21	-0,16436	FE25	0,20289
	S2	0,00000	D8	-0,23360	F14	0,54998	FD23	-0,26129	FE26	-0,19477
	S3	0,38201	D9	-0,16346	F15	0,66949	FD24	-0,02559	FE27	-0,06532
	S4	0,44974	D10	-0,18875	F16	0,36244			FE28	-0,03251
	S5	0,19958	D11	-0,15744	F17	0,36093			FE29	-1,23302
	S6	0,37538	D12	-0,04726	F18	0,48496			FE30	-0,67250
	Média	0,28733	Média	-0,16973	Média	0,53036	Média	-0,15041	Média	-0,33254
	DP	0,16386	DP	0,06784	DP	0,16056	DP	0,11847	DP	0,52793
	Mediana	0,34634	Mediana	-0,17610	Mediana	0,51747	Mediana	-0,16436	Mediana	-0,13004
			P	0,0051	P	0,0656	P	0,0282	P	0,0131
Miogenina	S1	0,01626	D7	-0,78479	F13	1,35554	FD21	-0,54727	FE25	1,55783
	S2	0,00000	D8	-0,34679	F14	1,87030	FD23	-0,65324	FE26	0,48285
	S3	0,03673	D9	-0,45486	F15	2,16049	FD24	-0,64330	FE27	0,39886
	S4	-0,16436	D10	-0,53914	F16	1,34229			FE28	1,12886
	S5	-0,21825	D11	-0,54787	F17	1,48167			FE29	-0,05720
	S6	0,32752	D12	-0,45726	F18	1,43802			FE30	0,42385
	Média	-0,00035	Média	-0,52179	Média	1,60805	Média	-0,61460	Média	0,65584
	DP	0,19159	DP	0,14793	DP	0,33264	DP	0,05852	DP	0,58233
	Mediana	0,00813	Mediana	-0,49820	Mediana	1,45984	Mediana	-0,64330	Mediana	0,45335
			P	0,0051	P	0,0051	P	0,0282	P	0,0306

Fonte: Santos (2012).

Figura 22- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes MyoD, Myf-5 e miogenina no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

A análise dos genes da via do BMP mostrou que os animais dos grupos F e FE apresentaram diminuição significativa na expressão relativa de BMP-4 ($p < 0,05$), quando comparados aos controles (S), o mesmo ocorrendo com o gene Id-1, nos grupos F e FD (Quadro 6 e Fig. 23). Não houve diferença entre os grupos experimentais, na quantificação da expressão relativa de Noggin, quando comparado ao grupo controle (S).

Quadro 6- Quantificação da expressões relativas e níveis de significância dos genes Noggin, BMP-4 e Id- 1 no grupo controle (salina) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Gene	Grupo S	QR	Grupo D	QR	Grupo F	QR	Grupo FD	QR	Grupo FE	QR
Noggin	S1	-0,47382	D7	-0,56714	F13	-0,11710	FD21	-0,16346	FE25	-0,10325
	S2	0,00000	D8	-0,54246	F14	-0,42897	FD23	-0,17761	FE26	-0,02739
	S3	-0,10747	D9	-0,32120	F15	-0,35100	FD24	-0,52018	FE27	-0,56383
	S4	-0,02679	D10	-0,28508	F16	-0,01927			FE28	-0,33264
	S5	-0,28116	D11	-0,02468	F17	-0,17369			FE29	-0,13125
	S6	-0,01987	D12	-0,18333	F18	-0,33414			FE30	-0,25588
	Média	-0,15152	Média	-0,32065	Média	-0,23736	Média	-0,28708	Média	-0,23571
	DP	0,18893	DP	0,20865	DP	0,15816	DP	0,20199	DP	0,19458
	Mediana	-0,06713	Mediana	-0,30314	Mediana	-0,25392	Mediana	-0,17761	Mediana	-0,19356
			P	0,1282	P	0,3785	P	0,2453	P	0,2980
BMP-4	S1	-0,14781	D7	-0,01024	F13	-0,23149	FD21	-0,13637	FE25	-0,34859
	S2	0,00000	D8	-0,12553	F14	-0,42024	FD23	-0,10446	FE26	-0,39194
	S3	0,28538	D9	-0,17911	F15	-0,13938	FD24	-0,19988	FE27	-0,44131
	S4	0,18664	D10	0,02198	F16	-0,02408			FE28	-0,50001
	S5	0,04184	D11	0,04515	F17	-0,22035			FE29	-0,49670
	S6	0,18604	D12	-0,03131	F18	-0,42385			FE30	-0,46208
	Média	0,09201	Média	-0,04651	Média	-0,24323	Média	-0,14690	Média	-0,44011
	DP	0,15728	DP	0,08771	DP	0,15712	DP	0,04858	DP	0,05995
	Mediana	0,11394	Mediana	-0,02077	Mediana	-0,22592	Mediana	-0,13637	Mediana	-0,45170
			P	0,1282	P	0,0131	P	0,0933	P	0,0051
Id-1	S1	-0,99761	D7	-0,91874	F13	-0,66919	FD21	-2,03015	FE25	-1,29262
	S2	0,00000	D8	-0,80977	F14	-0,82603	FD23	-2,09848	FE26	-0,96209
	S3	-0,65444	D9	-0,58189	F15	-0,58279	FD24	-2,10209	FE27	-1,38715
	S4	-0,03101	D10	-0,53764	F16	-1,29052			FE28	-1,31580
	S5	-0,12764	D11	-0,44613	F17	-2,06055			FE29	-2,07650
	S6	-0,56985	D12	-0,74655	F18	-1,36668			FE30	-1,28991
	Média	-0,39676	Média	-0,67345	Média	-1,13263	Média	-2,07691	Média	-1,38735
	DP	0,40522	DP	0,18033	DP	0,55711	DP	0,04054	DP	0,36861
	Mediana	-0,34874	Mediana	-0,66422	Mediana	-1,05827	Mediana	-2,09848	Mediana	-1,30421
			P	0,2980	P	0,0306	P	0,0282	P	0,0538

Fonte: Santos (2012).

Figura 23- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes BMP-4, Noggin e Id-1 no grupo controle (salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

4.1.4 Análise por Microarranjos de expressão de DNA (Microarray)

Foi realizado um estudo comparativo, em cada um dos grupos avaliados, utilizando um *chip* de expressão para genes murinos. As vias obtidas após o estudo de *Microarray* são mostradas abaixo. As únicas vias com resultados relevantes envolvem os grupos D, FD e FE, comparando os mesmos ao grupo controle (S). Os genes destacados em verde estão com sua expressão diminuída, enquanto os destacados em vermelho estão com expressão aumentada. No quadro 7 temos $\log_2$ do *Fold Change*, ou seja, o quanto os genes encontram-se diferencialmente expressos.

No grupo que recebeu Decadurabolin diretamente (D) observamos diminuição na expressão do receptor de Activina tipo IC, com presença dos genes de Smad2, MyoD e do receptor de andrógeno (Fig.24, via 1, circulados) e aumento da expressão do gene da miosina e troponina T (Fig.24, via 2, circulados). Nos grupos FD (Decadurabolin pós-Flutamida) e FE (ação da testosterona endógena por 35 dias, pós suspensão da Flutamida) observamos o mesmo comportamento em relação ao receptor de Activina e Smad2, ou seja, diminuição em sua expressão (Fig.25, circulados), e nada digno de nota em relação ao gene da miosina.

Quadro 7- Análise de microarranjo de DNA nos animais normais, mostrando os genes diferencialmente expressos nos grupos que receberam Decadurabolin diretamente (D) ou após Flutamida (FD), e naqueles sob ação da testosterona endógena após Flutamida (FE) em relação ao grupo controle (salina).

Grupo	Probe ID	Símbolo	Gene	Fold Change	$\log_2$ Fold Change
D	10377018	Myh3	<i>myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic</i>	9,8904	3,3060
	10377148	Myh8	<i>myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal</i>	3,0698	1,6181
	10381798	Myl4	<i>myosin, light polypeptide 4</i>	3,0799	1,6229
	10413726	Tnnc1	<i>troponin C, cardiac/slow skeletal</i>	2,9702	1,5705
	10536789	Lep	<i>leptin</i>	0,1411	-2,8250
	10482814	Acvr1c	<i>activin A receptor, type IC</i>	0,2142	-2,2230
F	10536789	Lep	<i>leptin</i>	0,4131	-1,2753
FD	10482814	Acvr1c	<i>activin A receptor, type IC</i>	0,2159	-2,2119
	10536789	Lep	<i>leptin</i>	0,1541	-2,6972
FE	10482814	Acvr1c	<i>activin A receptor, type IC</i>	0,3663	-1,4489
	10536789	Lep	<i>leptin</i>	0,2464	-2,0205

Fonte: Santos (2012).

Figura 25-Análise das vias dos grupos FD e FE comparados ao grupo controle (S), com genes do receptor de Activina IC e Smad2 circulados. Em verde: expressão diminuída. Em branco: expressão inalterada.

Fonte: Santos (2012).

4.2 Experimento 2 - Efeitos do esteróides anabolizantes no músculo distrófico.

4.2.1 Avaliação do peso corpóreo

Neste experimento animais afetados (*Large^{myd}*) também foram submetidos ao mesmo tratamento com esteróide anabolizante (Decadurabolin) e inibidores do receptor de andrógeno (Flutamida). Além disso, foram realizadas avaliações funcionais, nas fases pré e pós-tratamento. Nas tabelas 4 e 5 e figura 26 estão apresentadas as médias do aumento/decrécimo no peso dos grupos avaliados (*Wild-type* e afetados, controles e experimentais), bem como o desvio-padrão e o nível de significância (p) pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 4- Resultado da genotipagem, valores individuais das medidas do peso (pré e pós-tratamento) e variação no peso nos animais normais (grupo *Wild-type* salina) e afetados nos diferentes tratamentos.

Genotipagem	Tratamento	Identificação	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Aumento/decréscimo do peso (g)
Wild-type	Wild-type salina	31	33,60	37,59	3,99
		32	33,30	36,27	2,97
		33	30,53	32,72	2,19
		34	34,90	35,30	0,40
		35	25,54	26,17	0,63
		36	30,62	30,81	0,19
		Mediana	31,96	34,01	1,41
		Média	31,42	33,14	1,73
		Desvio-padrão	3,36	4,21	1,56
Large (LG)	LG salina	7LG	27,78	29,00	1,22
		8LG	25,66	28,47	2,81
		9LG	27,18	26,47	-0,71
		10LG	30,81	32,40	1,59
		11LG	22,28	20,23	-2,05
		12LG	28,06	28,93	0,87
		Mediana	27,48	28,70	1,05
		Média	26,96	27,58	0,62
		Desvio-padrão	2,84	4,08	1,73
	LG Decadurabolin®	1LG	26,76	31,00	4,24
		2LG	26,75	28,00	1,25
		3LG	26,51	29,60	3,09
		4LG	30,96	34,63	3,67
		5LG	32,00	37,75	5,75
		6LG	29,80	34,55	4,75
		Mediana	28,28	32,78	3,96
		Média	28,80	32,59	3,79
		Desvio-padrão	2,43	3,67	1,54
	Flutamida	13LG	26,05	26,14	0,09
		14LG	27,35	26,26	-1,09
		15LG	25,00	24,05	-0,95
		19LG	21,00	22,56	1,56
		20LG	30,82	31,36	0,54
		21LG	28,80	30,45	1,65
		22LG	30,47	30,62	0,15
		22LG	28,67	30,24	1,57
		24LG	28,00	28,03	0,03
		Mediana	28,74	30,35	1,05
		Média	27,35	27,75	0,39
		Desvio-padrão	1,67	3,17	1,04
	LG Flutamida+ testosterona endógena	19LG	22,56	21,69	-0,87
		20LG	31,36	35,05	3,69
		21LG	30,45	32,06	1,61
		22LG	30,62	33,87	3,25
		23LG	30,24	33,38	3,14
		24LG	28,03	30,00	1,97
		Mediana	30,35	32,72	2,56
		Média	28,88	31,01	2,13
		Desvio-padrão	3,29	4,88	1,67

Fonte: Santos (2012).

Observou-se que a média do peso inicial do grupo *Wild-type* salina (31,42 g) é significativamente maior do que a média do peso inicial de todos os animais *Large^{myd}* (LG) (entre 28,8 g e 26,96 g), da mesma idade ($p < 0,05$). Isto porque os camundongos *Large^{myd}* são naturalmente menores, devido ao processo distrófico. Por outro lado, a variação do peso no mesmo período de tempo não variou nos grupos *Wild-type* (controle normal) e LG salina, mostrando que a taxa de crescimento com o tempo é similar.

Por isso, optamos por comparar todos os parâmetros dos grupos experimentais com o grupo LG salina (controle distrófico).

Os resultados mostram que os animais que receberam Decadurabolin diretamente (LG Decadurabolin) apresentaram aumento significativo de massa em comparação ao grupo LG salina ($p < 0,05$). Os animais que receberam somente a Flutamida (em lilás), durante 35 dias, não mostraram nenhum crescimento. A média do aumento de massa nos animais do grupo LG Flutamida+testosterona endógena, que estiveram sob a ação da testosterona endógena após Flutamida (LG Flutamida+testosterona endógena), não variou de forma estatisticamente significativa, quando comparada aos animais do grupo LG salina.

Na tabela 5 e figura 26 observamos a média do aumento da massa nos grupos controles (*Wild-type* salina e LG salina) e experimentais e os níveis de significância das comparações entre os grupos controle *Wild-type* salina e LG salina (P em verde) e entre o grupo LG salina e os demais grupos experimentais (P em rosa). Não há diferenças significantes na massa corpórea quando comparamos o grupo LG salina com o grupo *Wild-typesalina*. Observamos que o aumento de massa dos animais do grupo LG Decadurabolin é significativo quando comparado aos animais do grupo LG salina ($p < 0,05$). Nos grupos que receberam Flutamida durante 35 dias (grupos LG Flutamida e LG Flutamida+testosterona endógena) não há diferenças estatisticamente significantes na massa corpórea em relação ao grupo LG salina.

Tabela 5- Média do aumento de massa corpórea nos grupos *Wild-type* salina, LG salina e LG Decadurabolin, tratados com Flutamida por 35 dias (F e FE) e LG Flutamida +testosterona endógena. Em lilás: $p < 0,01$.

Grupo/Tratamento	n	Aumento de massa(g)-média	Desvio-padrão	P	P
<i>Wild-type</i> salina	6	1,73	1,56	#	#
LG salina	6	0,62	1,73	0,276	#
LG Decadurabolin®	6	3,79	1,54	0,047	0,0131
Flutamida	9	0,39	1,04	0,109	0,6800
LG Flutamida+ testosterona endógena	3	2,13	1,67	0,676	0,0927

Fonte: Santos (2012).

Figura 26- Média do aumento/decréscimo de massa corpórea nos grupos *Wild-type* salina, LG salina, LG Decadurabolin, tratados com Flutamida por 35 dias (F e FE) e LG Flutamida +testosterona endógena (*= $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

4.2.2 Mensuração das fibras musculares

Para cada animal, foram medidas entre 250-300 fibras, em corte histológico do músculo gastrocnêmico, corado com hematoxilina-eosina (HE). A média dos diâmetros, bem como o desvio e nível de significância, pelo teste T-Student, estão apresentados na tabela 6 e na figura 27.

Na comparação entre os controles observamos que o grupo LG salina possui diâmetro de fibra significativamente menor em relação aos animais normais (grupo *Wild-type* salina).

O grupo LG Decadurabolin não apresentou diferenças significantes no diâmetro das fibras, quando comparados ao LG salina. No grupo LG Flutamida, que recebeu Flutamida durante 35 dias e foram sacrificados após este período, e naqueles que estiveram sob a ação da testosterona endógena pós-Flutamida (grupo LG Flutamida+testosterona endógena), observamos aumento significativo no diâmetro das fibras em relação grupos LG salina ($p < 0,05$).

Tabela 6- Média da mensuração diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio nos grupos controles (*Wild-type* salina e LG salina) e nos demais grupos experimentais (* $p < 0,05$). Em lilás $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Grupo	n	nº fibras	Diâmetro mín. (µm)	Diâmetro máx. (µm)	Média (µm)	Desvio-padrão (µm)	Coef. de variação	P	P
<i>Wild-type</i> salina	6	1490	14,410	75,290	38,615	8,720	22,580	#	#
LG salina	6	1436	6,900	105,630	35,319	14,388	40,740	<0,001	#
LG Decadurabolin	6	1368	7,020	97,650	36,268	13,823	38,110	<0,001	0,075
LG Flutamida	3	575	9,620	89,530	39,764	15,198	38,220	0,0880	<0,001
LG Flut.+testosterona end.	5	1102	7,260	107,520	37,383	15,245	40,780	0,0160	0,001

Fonte: Santos (2012).

Figura 27- Média da mensuração do diâmetro das fibras musculares e histologia (HE, 200x) no grupos controle (*Wild-type* salina e LG salina) e demais grupos experimentais (*= $p < 0,05$).

Wild-type

LG salina

LG Decadurabolin

LG Flutamida

LG Flutamida+testosterona endógena

Fonte: Santos (2012).

4.2.3 Análise funcional do músculo distrófico

Os resultados obtidos nas avaliações funcionais força-medida pelo *Grip strength* nas patas dianteiras (GD) e traseiras (GT), resistência nos membros anteriores (RMA) e resistência e equilíbrio nos quatros membros (REQM), estão apresentados nas tabelas 7 e 8, respectivamente. As avaliações foram realizadas antes do início do tratamento (pré-tratamento, em rosa) e no término do tratamento (pós-tratamento, em azul) nos grupos controles e experimentais.

Tabela 7- Resultados obtidos nas avaliações *Força-Grip strength* nas patas dianteiras (GD) e nas patas traseiras (GT) nos grupos controle (*Wild-type* salina e LG salina) e demais grupos experimentais, pré (em azul) e pós-tratamento (em rosa).

Genotipagem	Grupo	Identificação	Avaliação funcional							
			GD (pré-trat.)		GD (pós-trat.)		GT (pré-trat.)		GT (pós-trat.)	
			Tempo (s)	Média (s)	Tempo (s)	Média (s)	Tempo (s)	Média(s)	Tempo (s)	Média(s)
Wild-type	Wild-type salina	31	2,20/1,76/1,76	1,93	2,26/2,01/1,99	2,09	1,92/1,91/1,58	1,80	1,96/1,53/1,50	1,66
		32	2,44/2,07/1,97	2,16	1,96/1,89/1,72	1,86	1,70/1,51/1,46	1,56	1,70/1,53/1,49	1,57
		33	1,54/1,38/1,19	1,37	2,07/1,87/1,85	1,93	1,78/1,72/1,53	1,68	1,92/1,90/1,78	1,87
		34	2,76/2,02/1,93	2,24	1,92/1,76/1,74	1,81	1,34/1,24/1,23	1,27	1,51/1,51/1,33	1,45
		35	1,55/1,16/1,11	1,27	1,70/1,67/1,40	1,59	1,65/1,58/1,56	1,60	1,96/1,44/1,42	1,61
		36	2,02/1,65/1,63	1,77	1,85/1,45/1,41	1,57	1,72/1,52/1,40	1,55	1,86/1,75/1,41	1,67
		Mediana		1,85		1,84		1,58		1,64
		Média		1,79		1,81		1,58		1,64
		Desvio-padrão		0,40		0,20		0,18		0,14
Large (LG)	LG salina	7LG	1,10/0,89/0,85	0,95	1,25/1,08/0,97	1,10	1,01/0,99/0,98	0,99	1,09/1,07/0,97	1,04
		8LG	1,32/1,11/0,92	1,12	1,26/1,17/1,14	1,19	0,91/0,91/0,80	0,87	1,20/1,17/1,02	1,13
		9LG	0,94/0,74/0,66	0,78	0,99/0,79/0,78	0,79	0,99/0,97/0,97	0,98	1,08/0,97/0,97	1,01
		10LG	1,26/0,96/0,89	1,04	0,99/0,90/0,80	0,90	0,89/0,88/0,75	0,84	1,13/1,12/1,07	1,11
		11LG	0,78/0,72/0,67	0,72	0,67/0,58/0,55	0,60	0,94/0,94/0,93	0,94	0,85/0,83/0,80	0,83
		12LG	0,87/0,83/0,72	0,81	0,88/0,77/0,74	0,80	0,90/0,80/0,79	0,83	1,09/1,05/0,94	1,03
		Mediana		0,88		0,85		0,91		1,04
		Média		0,90		0,90		0,91		1,03
		Desvio-padrão		0,16		0,22		0,07		0,11
	LG Decadurabolin	13LG	0,58/0,48/0,38	0,48	1,21/1,18/1,10	1,16	1,37/1,17/1,13	1,22	1,35/1,23/1,09	1,22
		20LG	0,54/0,42/0,42	0,46	0,88/0,87/0,85	0,87	1,28/1,27/1,13	1,23	1,15/0,95/0,92	1,01
		31LG	0,65/0,58/0,48	0,57	0,88/0,84/0,79	0,84	1,20/1,12/0,99	1,10	1,04/1,00/0,96	1,00
		41LG	0,62/0,46/0,45	0,51	1,18/1,01/0,83	1,01	1,04/0,85/0,79	0,89	1,78/1,26/1,24	1,43
		51LG	0,47/0,38/0,36	0,40	1,17/1,17/0,94	1,09	0,81/0,78/0,77	0,79	1,34/1,10/1,08	1,17
		61LG	0,56/0,52/0,51	0,53	1,32/1,18/0,85	1,12	1,22/1,09/1,04	1,12	2,03/1,49/1,18	1,57
		Mediana		0,50		1,05		1,11		1,20
		Média		0,49		1,02		1,06		1,23
		Desvio-padrão		0,06		0,13		0,18		0,23
	LG Flutamida	131LG	0,88/0,76/0,87	0,84	0,89/0,89/0,86	0,88	0,76/0,76/0,70	0,74	1,13/0,82/0,90	0,95
		141LG	0,78/0,82/0,85	0,82	0,86/0,88/0,92	0,88	0,83/0,92/0,88	0,88	0,93/0,95/0,88	0,92
		151LG	0,65/0,53/0,67	0,62	0,81/0,79/0,77	0,82	0,87/0,77/0,74	0,79	0,73/0,74/0,79	0,75
		Mediana		0,51		0,88		0,91		1,03
		Média		0,76		0,86		0,80		0,87
		Desvio-padrão		0,24		0,29		0,33		0,38
	LG Flutamida+testosterona	191LG	0,65/0,70/0,68	0,68	0,87/0,73/0,63	0,74	1,38/1,04/0,78	1,07	0,87/1,04/0,84	0,92
		201LG	1,01/0,97/0,90	0,96	0,92/0,80/0,92	0,88	1,27/1,42/1,01	1,23	1,06/1,08/0,79	0,98
		211LG	0,96/1,02/1,06	1,01	0,91/0,83/0,79	0,84	0,94/0,83/0,94	0,90	0,79/0,91/0,98	0,89
		221LG	0,95/0,81/0,95	0,90	0,90/0,94/0,77	0,87	1,16/0,98/1,10	1,08	0,97/1,10/1,16	1,08
		231LG	1,01/0,92/1,06	1,00	0,75/0,74/0,74	0,74	0,87/0,98/1,05	0,97	1,11/1,12/1,10	1,11
		241LG	0,81/0,90/0,81	0,84	0,85/0,79/0,81	0,82	1,15/1,16/0,98	1,10	1,04/0,93/0,88	0,95
		Mediana		0,93		0,83		1,08		0,97
		Média		0,90		0,82		1,06		0,99
		Desvio-padrão		0,12		0,06		0,11		0,09

Fonte: Santos (2012).

Tabela 8- Resultados obtidos nas avaliações resistência nos membros anteriores (RMA), resistência e equilíbrio quatros membros (REQM) nos grupos controle (*Wild type* salina e LG salina) e demais grupos experimentais, pré (em azul) e pós-tratamento (em rosa).

Genotipagem	Grupo	Identificação	Avaliação funcional							
			RMA(pré-trat.)		RMA(pós-trat.)		REQM (pré-trat.)		REQM (pós-trat.)	
			Tempo (s)	Média (s)	Tempo (s)	Média (s)	Tempo (s)	Média(s)	Tempo (s)	Média(s)
Wild-type	Wild-type salina	31	60/60/25/	48,3	60/60/60	60,0	60/45/60/	55,0	60/60/60/	60,0
		32	60/60/60/	60,0	60/15/60	45,0	60/50/47/	52,3	60/14/60/	44,7
		33	60/60/60/	60,0	60/60/24	48,0	60/60/60/	60,0	60/60/23/	47,7
		34	60/50/14/	41,3	60/60/60	60,0	60/50/14/	41,3	60/60/60/	60,0
		35	60/60/60/	60,0	60/60/60	60,0	60/60/60/	60,0	60/60/60/	60,0
		36	60/40/60/	53,3	60/60/60	60,0	60/40/60/	53,3	60/60/60/	60,0
		Mediana		56,7		60,0		54,2		60,0
		Média		53,8		55,5		53,7		55,4
		Desvio-padrão		7,8		7,0		6,9		7,2
Large (LG)	LG salina	7LG	3/5/9/	5,7	12/18/5/	11,7	3/6/2/	3,7	0/1/3/	1,3
		8LG	10/11/10/	10,3	13/4/5/	7,3	2/2/0/	1,3	0/10/1/	3,7
		9LG	3/5/4/	4,0	6/7/5/	6,0	1/0/3/	1,3	1/1/1/	1,0
		10LG	4/3/3/	3,3	1/1/1/	1,0	0/1/0/	0,3	1/1/1/	1,0
		11LG	11/4/4/	6,3	8/3/6/	5,7	0/1/1/	0,7	1/2/1/	1,3
		12LG	5/3/2/	3,3	5/3/1/	3,0	4/8/1/	4,3	1/1/1/	1,0
		Mediana		4,9		5,9		1,3		1,2
		Média		5,5		5,8		1,9		1,6
		Desvio-padrão		2,7		3,7		1,7		1,1
	LG Decadurabolin	11LG	6/1/3/	3,3	7/5/5/	5,7	1/1/1/	1,0	16/1/1/	6,0
		21LG	5/2/1/	2,7	6/2/3/	3,7	1/1/1/	1,0	1/1/1/	1,0
		31LG	2/3/2/	2,3	3/4/2/	3,0	1/1/1/	1,0	5/3/2/	3,3
		41LG	3/0/0/	1,0	7/5/1/	4,3	1/0/0/	0,3	7/5/1/	4,3
		51LG	0/1/0/	0,3	5/2/1/	2,7	0/1/0/	0,3	5/2/1/	2,7
		61LG	4/0/0/	1,3	5/1/3/	3,0	1/0/0/	0,3	5/1/3/	3,0
		Mediana		1,8		3,4		0,7		3,2
		Média		1,8		3,7		0,7		3,4
		Desvio-padrão		1,1		1,1		0,4		1,7
	LG Flutamida	13LG	27/14/8/	16,3	24/10/6/	13,3	31/15/0/	15,3	13/1/1/	5,0
		14LG	3/4/19/	8,7	13/5/8/	8,7	1/0/1/	0,7	19/1/1/	7,0
		15LG	15/11/3/	9,7	3/31/8/	14,0	1/1/2/	1,3	12/2/1/	8,3
		Mediana		9,7		13,3		1,3		7,0
		Média		11,6		12,0		5,8		6,8
		Desvio-padrão		4,1		2,9		8,3		1,7
	LG Flutamida+ testosterona endógena	19LG	37/16/9/	20,7	14/12/40/	22	52/14/42/	36,0	1/1/0/	0,7
		20LG	8/12/7/	9,0	13/6/4/	7,7	12/1/1/	4,7	1/0/5/	2,0
		21LG	5/3/2/	3,3	3/5/3/	3,7	1/1/1/	1,0	1/0/0/	0,3
		22LG	5/4/3/	4,0	3/2/3/	2,7	15/7/1/	7,7	5/2/0/	2,3
		23LG	5/3/4/	4,0	3/6/4/	4,3	13/7/1/	7,0	1/2/0/	1,0
		24LG	4/4/5/	4,3	3/10/6/	6,3	1/9/1/	3,7	2/2/3/	2,3
		Mediana		4,2		5,3		5,9		1,5
		Média		7,6		7,8		10,0		1,4
		Desvio-padrão		6,8		7,2		13,0		0,9

Fonte: Santos (2012).

O grupo *Wild-type* salina (em amarelo) ilustra a força dos camundongos com musculatura esquelética normal. Nos grupos compostos por animais distróficos, as comparações realizadas, a partir das análises estatísticas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, foram feitas entre todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, que inclui os grupos LG salina, LG Decadurabolin, LG Flutamida, LG Flutamida+testosterona endógena, em marrom) versus o efeito pós-tratamento.

4.2.3.1 Teste de Força

Nas tabelas 9 e 10 observamos os valores médios da força nas patas dianteiras (GD) e traseiras (GT) em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e nos demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul), bem como o desvio padrão e o nível de significância, no teste não-paramétrico de Mann-Whitney, da comparação do grupo *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) com os diferentes grupos experimentais pós-tratamento.

Os animais do grupo LG Decadurabolin tiveram melhora significativa na força, das patas dianteiras e traseiras, quando comparados aos animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG). Nos grupos LG Flutamida e LG Flutamida+testosterona endógena não observamos melhora significativa na força das patas dianteiras e traseiras (Fig. 28 e 29).

Tabela 9-Médias e nível de significância para avaliação funcional *Força-Grip strength*, patas dianteiras (GD), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul). Em lilás: $p < 0,01$.

Grupo	n	GD (N)-média	GD (N)-mediana	Desvio-padrão	P
LG (todos os grupos)	21	0,76	0,81	0,21	#
LG Decadurabolin	6	1,02	1,05	0,13	0,0112
LG salina	6	0,90	0,85	0,22	0,2938
LG Flutamida	3	0,86	0,87	0,26	0,5127
LG Flutamida+testosterona endógena	6	0,82	0,83	0,09	0,6831

Fonte: Santos (2012).

Tabela 10- Médias e nível de significância para avaliação funcional *Força-Grip strength*, patas traseiras (GT), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul). Em lilás: $p < 0,01$.

Grupo	n	GT(N)-média	GT(N)-mediana	Desvio-padrão	P
LG (todos os grupos)	21	0,98	0,97	0,15	#
LG Decadurabolin	6	1,23	1,20	0,18	0,0168
LG salina	6	1,03	1,04	0,07	0,4142
LG Flutamida	3	0,87	0,94	0,32	0,3370
LG Flutamida+testosterona endógena	6	0,99	0,97	0,11	0,7264

Fonte: Santos (2012).

Figura 28- Média da força de todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais na avaliação funcional pós-tratamento, *Força-Grip strength* nas patas dianteiras (GD) (*= $p < 0,05$)

Fonte: Santos (2012).

Figura 29- Média da força de todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional *Força-Grip strength* nas patas traseiras (GT) (*= $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

4.2.3.2 Teste de Suspensão pelas patas

Nas tabelas 11 e 12 observamos os valores médios dos tempos de suspensão pelas patas, nas avaliações de resistência nos membros anteriores (RMA) e resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e nos demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul), bem como o desvio padrão e o nível de significância, no teste não-paramétrico de Mann-Whitney, da comparação do grupo *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) com os diferentes grupos experimentais pós-tratamento.

Não observamos diferenças significativas no tempo de suspensão das avaliações RMA e REQM, entre os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) com os demais grupos experimentais pós-tratamento.

Tabela 11- Médias e nível de significância para a avaliação funcional resistência nos membros anteriores (RMA), em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul).

Grupo	n	RMA(s)-média	RMA(s)-mediana	Desvio-padrão	P (grupo LG)
LG (todos os grupos)	21	5,9	4,0	5,1	#
LG Decadurabolin	6	3,7	3,4	1,1	0,4483
LG salina	6	5,8	5,9	3,7	0,7930
LG Flutamida	3	12,0	7,3	4,8	0,0606
LG Flutamida+testosterona endógena	6	7,8	5,3	7,2	0,4483

Fonte: Santos (2012).

Tabela 12- Médias e nível de significância para a avaliação funcional resistência e equilíbrio nos quatro membros nos membros anteriores (REQM) em todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG, em rosa) e demais grupos experimentais pós-tratamento (em azul).

Grupo	n	REQM(s)-média	REQM(s)-mediana	Desvio-padrão	P (grupo LG)
LG (todos os grupos)	21	4,4	2,3	8,1	#
LG Decadurabolin	6	3,4	3,2	1,7	0,3507
LG salina	6	1,6	1,2	1,1	0,9303
LG Flutamida	3	6,8	3,3	3,2	0,0606
LG Flutamida+testosterona endógena	6	1,4	1,5	0,9	0,6201

Fonte: Santos (2012).

Figura 30- Média do tempo suspensão de todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional resistência nos membros anteriores (RMA).

Fonte: Santos (2012).

Figura 31- Média do tempo suspensão de todos os animais *Large^{myd}* pré-tratamento (LG) e demais grupos experimentais pós-tratamento, na avaliação funcional resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM).

Fonte: Santos (2012).

4.2.4 Análise das quantificações das expressões relativas dos genes estudados

Os resultados da quantificação da expressão relativa do gene da miostatina, obtidos a partir da análise por PCR em tempo real, nos grupos controle *Wild-type* salina, LG salina e LG não tratado, estão apresentados no quadro 8 e figura 32. O animal escolhido como normalizador foi o número 31, por apresentar valor de quantificação da expressão relativa da miostatina mais próximo da média do grupo *Wild-type* salina.

O grupo LG salina foi comparado aos grupos *Wild-type* salina (em verde) e LG não tratado (em rosa) e não houveram diferenças estatisticamente significantes nestas comparações. Portanto, não há diferença na expressão da miostatina no processo distrófico, mesmo quando os animais *Large^{myd}* recebem injeções de salina e são avaliados funcionalmente.

Quadro 8- Quantificação das expressões relativas e níveis de significância da expressão do gene da miostatina para os grupos controle (*Wild-type* salina, LG salina e LG não tratado) e comparações entre grupos LG salina com *Wild-type* salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa).

Gene	<i>Wild-type</i> salina	QR	LG Salina	QR	LG não tratado	QR
Miostatina	31	0,00000	LG7	-0,14148	LG25	-0,74144
	32	-0,09753	LG8	-0,49760	LG26	-0,61681
	33	0,64029	LG9	-0,67220	LG27	-0,69598
	34	-0,11861	LG10	0,04997	LG28	-0,24895
	35	0,08730	LG11	-0,03372	LG29	-0,47472
	36	-0,01445	LG12	0,00090		
	Média	0,08283	Média	-0,21569	Média	-0,55558
	DP	0,25827	DP	0,27203	DP	0,17808
	Mediana	-0,00722	Mediana	-0,08760	Mediana	-0,61681
			P	0,2298		
			P	0,0828		

Fonte: Santos (2012).

Figura 32- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina para os grupos controle: *Wild-type* salina e LG salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) e comparação do grupo LG salina com *Wild-type* salina e LG não tratado.

Fonte: Santos (2012).

Em seguida, comparamos a expressão relativa da miostatina no grupo LG salina, com os diferentes grupos experimentais. Os resultados estão apresentados no quadro 9 e figura 33. Quando comparados ao grupo LG salina (em laranja) os animais do grupo LG Flutamida apresentam expressão diminuída do gene da miostatina ($p<0,05$). Não houve alterações de sua expressão nos grupos LG Decadurabolin e LG Flutamida+testosterona endógena.

Quadro 9- Quantificações das expressões relativas e níveis de significância do gene da miostatina no grupo controle (LG salina) e diferentes grupos experimentais. Em azul: $p<0,05$.

Gene	LG Salina	QR	LG Decadurabolin	QR	LG Flutamida	QR	LG Flutamida+testosterona endógena	QR
Miostatina	LG7	-0,14148	LG1	-0,06111	LG13	-0,86877	LG19	-0,20922
	LG8	-0,49760	LG2	0,04726	LG14	-0,73843	LG20	-0,40067
	LG9	-0,67220	LG3	-0,27093	LG15	-0,92085	LG21	-0,22818
	LG10	0,04997	LG4	-0,18574			LG22	-0,14148
	LG11	-0,03372	LG5	-0,05720			LG23	-0,52710
	LG12	0,00090	LG6	0,21132			LG24	-0,26701
	Média	-0,21569	Média	-0,05273	Média	-0,84268	Média	-0,29561
	DP	0,27203	DP	0,15552	DP	0,07673	DP	0,12988
	Mediana	-0,08760	Mediana	-0,05915	Mediana	-0,86877	Mediana	-0,24760
			P	0,6889	P	0,0282	P	0,3367

Fonte: Santos (2012).

Figura 33- Valores individuais da quantificação das expressões relativas do gene da miostatina no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

Os resultados da análise dos genes da cascata de regeneração estão apresentados no quadro 10 e figura 34, onde observamos a quantificação da expressão relativa destes genes nos grupos *Wild-typesalina*, LG salina e LG não tratado. Quando comparado ao grupo *Wild-typel salina* e LG não tratado, o grupo LG salina (em laranja) apresenta aumento significativo da expressão de todos os genes da cascata de regeneração ($p < 0,05$). Estes resultados mostram que o processo de regeneração é naturalmente ativado devido ao processo de degeneração do modelo *Large^{myd}*. Por outro lado, tanto as injeções repetidas de salina, como o processo de avaliação funcional parecem ativar ainda mais o processo de regeneração.

Quadro 10- Quantificações das expressões relativas e níveis de significância da expressão dos genes da cascata de regeneração para os grupos controle (*Wild-type* salina, LG salina e LG não tratado) e comparações entre grupos LG salina com *Wild-type* salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa). Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Gene	<i>Wild-type</i> salina	QR	LG Salina	QR	LG não tratado	QR
MyoD	31	0,00000	LG7	1,04728	LG25	0,14781
	32	0,09874	LG8	0,91965	LG26	-0,73120
	33	0,16948	LG9	1,39196	LG27	-1,03073
	34	-0,02589	LG10	1,06866	LG28	-0,19326
	35	-0,17670	LG11	1,02410	LG29	-1,11291
	36	-0,06081	LG12	1,06715		
	Média	0,00080	Média	1,08647	Média	-0,58406
	DP	0,11110	DP	0,14564	DP	0,48769
	Mediana	-0,01294	Mediana	1,05722	Mediana	-0,73120
			P	0,0051		
Myf-5	31	0,00000	LG7	0,98226	LG25	0,39856
	32	-0,00572	LG8	0,77786	LG26	-0,22487
	33	0,06442	LG9	0,89737	LG27	0,22668
	34	0,03913	LG10	0,59032	LG28	0,59724
	35	0,07044	LG11	0,58881	LG29	0,27514
	36	0,18062	LG12	0,71284		
	Média	0,05815	Média	0,75824	Média	0,25455
	DP	0,06193	DP	0,14657	DP	0,27174
	Mediana	0,05178	Mediana	0,74535	Mediana	0,27514
			P	0,0051		
Miogenina	31	0,00000	LG7	2,14032	LG25	0,70561
	32	0,43800	LG8	2,65508	LG26	0,78810
	33	0,32993	LG9	2,94528	LG27	0,97142
	34	0,24564	LG10	2,12708	LG28	1,08642
	35	0,23691	LG11	2,26645	LG29	0,68575
	36	0,32752	LG12	2,22281		
	Média	0,26300	Média	2,39284	Média	0,84746
	DP	0,13504	DP	0,30366	DP	0,15637
	Mediana	0,28658	Mediana	2,24463	Mediana	0,78810
			P	0,0051		
			P	0,0081		

Fonte: Santos (2012).

Figura 34- Quantificações da expressões relativas dos genes da cascata de regeneração para os grupos controle: *Wild-type* salina e LG-salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) e comparações entre *Wild-type* salina com LG salina e LG não tratado (*= $p<0,05$).

Fonte: Santos (2012).

Quando comparados ao grupo LG salina (em laranja), todos os grupos tratados possuem diminuição significativa da expressão relativa dos genes da cascata de regeneração ($p < 0,05$), exceto no grupo LG Decadurabolin, em Myf-5, onde a expressão não se alterou (quadro 11 e Fig. 35). Portanto, o tratamento utilizado está aparentemente reduzindo o estímulo a regeneração, principalmente no grupo LG Flutamida.

Quadro 11- Quantificações das expressões relativas e níveis de significância dos genes da cascata de regeneração no grupo controle (LG salina) e diferentes grupos experimentais. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: 0,05.

Gene	LG Salina	QR	LG Decadurabolin	QR	LG Flutamida	QR	LG Flutamida+testosterona endógena	QR
MyoD	LG7	1,04728	LG1	0,42716	LG13	-0,44432	LG19	0,09964
	LG8	0,91965	LG2	0,32301	LG14	-2,41155	LG20	0,10807
	LG9	1,39196	LG3	0,25076	LG15	-1,31099	LG21	-0,76100
	LG10	1,06866	LG4	0,19838			LG22	0,07646
	LG11	1,02410	LG5	0,48225			LG23	-0,79984
	LG12	1,06715	LG6	0,31187			LG24	-0,92205
	Média	1,08647	Média	0,33224	Média	-1,38895	Média	-0,36645
	DP	0,14564	DP	0,09710	DP	0,80501	DP	0,46382
	Mediana	1,05722	Mediana	0,31744	Mediana	-1,31099	Mediana	-0,34227
			P	0,0051	P	0,0282	P	0,0051
Myf-5	LG7	0,98226	LG1	0,54517	LG13	-0,72187	LG19	-0,11529
	LG8	0,77786	LG2	0,22788	LG14	-0,99852	LG20	0,01866
	LG9	0,89737	LG3	0,60989	LG15	-1,02952	LG21	0,33354
	LG10	0,59032	LG4	0,67762			LG22	0,27213
	LG11	0,58881	LG5	0,42746			LG23	-0,07435
	LG12	0,71284	LG6	0,60326			LG24	-0,12583
	Média	0,75824	Média	0,51521	Média	-0,91664	Média	0,05148
	DP	0,14657	DP	0,14958	DP	0,13830	DP	0,18458
	Mediana	0,74535	Mediana	0,57421	Mediana	-0,99852	Mediana	-0,02785
			P	0,0656	P	0,0282	P	0,0051
Miogenina	LG7	2,14032	LG1	0,80104	LG13	1,19449	LG19	0,81007
	LG8	2,65508	LG2	0,78479	LG14	0,35672	LG20	0,87750
	LG9	2,94528	LG3	0,82151	LG15	0,19055	LG21	1,36848
	LG10	2,12708	LG4	0,62042			LG22	1,07769
	LG11	2,26645	LG5	0,56654			LG23	0,94012
	LG12	2,22281	LG6	1,11231			LG24	0,90730
	Média	2,39284	Média	0,78443	Média	0,58059	Média	0,99686
	DP	0,30366	DP	0,17489	DP	0,43936	DP	0,18485
	Mediana	2,24463	Mediana	0,79291	Mediana	0,35672	Mediana	0,92371
			P	0,0051	P	0,0282	P	0,0051

Fonte: Santos (2012).

Figura 35- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes da cascata de regeneração no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

A análise da expressão relativa dos genes da via do BMP, dos animais controle, encontra-se no quadro 12 e figura 36. O grupo LG salina, comparado ao grupo *Wild-type* salina, apresenta expressão diminuída de Noggin ($p < 0,05$), enquanto sua expressão não difere do grupo LG não tratado. A expressão relativa do gene do BMP-4 no grupo LG salina não difere daquela observada no controle normal (grupo *Wild-type* salina) e no grupo LG não tratado. A expressão de Id-1 encontra-se aumentada no grupo LG salina, quando a mesma é comparada ao grupo LG não tratado ($p < 0,05$), mas não se altera quando comparada ao grupo *Wild-type* salina.

Quadro 12 - Quantificação das expressões relativas e níveis de significância da expressão dos genes da via do BMP para os grupos controle (*Wild-type* salina, LG salina e LG não tratado) comparações entre grupos LG salina com *Wild-type* salina (p em verde) e LG não tratado (p em rosa). Em lilás: $p < 0,01$.

Gene	<i>Wild-type</i> salina	QR	LG Salina	QR	LG não tratado	QR
Noggin	31	0,00000	LG7	-0,62343	LG25	-1,19840
	32	-0,14570	LG8	-0,87961	LG26	-0,79954
	33	-0,30976	LG9	-0,59664	LG27	-0,87028
	34	-0,28658	LG10	-0,55028	LG28	-1,15866
	35	0,02890	LG11	-0,73090	LG29	-0,72849
	36	-0,41392	LG12	-0,71525		
	Média	-0,18784	Média	-0,68269	Média	-0,95107
	DP	0,16318	DP	0,10848	DP	0,19147
	Mediana	-0,21614	Mediana	-0,66934	Mediana	-0,87028
			P	0,0051		
BMP-4	31	0,00000	LG7	0,46389	LG25	-0,06141
	32	0,24955	LG8	0,36665	LG26	0,45004
	33	0,23119	LG9	0,18182	LG27	0,25527
	34	0,29290	LG10	0,28568	LG28	0,14660
	35	0,35883	LG11	-0,03582	LG29	0,36154
	36	0,32150	LG12	0,27002		
	Média	0,24233	Média	0,25537	Média	0,23041
	DP	0,11640	DP	0,15663	DP	0,17789
	Mediana	0,27123	Mediana	0,27785	Mediana	0,25527
			P	0,9362		
Id-1	31	0,00000	LG7	-0,14630	LG25	-2,42359
	32	-0,04967	LG8	-1,33988	LG26	-2,33118
	33	-0,13095	LG9	-0,67220	LG27	-2,62558
	34	-0,99009	LG10	-0,49038	LG28	-2,91758
	35	-0,15593	LG11	-1,45879	LG29	-2,79085
	36	-0,62193	LG12	-0,54035		
	Média	-0,32476	Média	-0,77465	Média	-2,61776
	DP	0,36013	DP	0,47056	DP	0,21897
	Mediana	-0,14344	Mediana	-0,60627	Mediana	-2,62558
			P	0,1282		
			P	0,0081		

Fonte: Santos (2012).

Figura 36- Quantificação das expressões relativas dos genes da via do BMP para os grupos controle: *Wild-type* salina e LG-salina (injetados e avaliados funcionalmente) e LG não tratados (animais que não foram submetidos a nenhuma injeção ou avaliação funcional) comparações entre LG salina com *Wild-type* salina e LG não tratado (*= $p<0,05$).

Fonte: Santos (2012).

O quadro 13 e a figura 37 mostram a quantificação das expressões relativas dos genes da via do BMP, quando o grupo LG salina é comparado aos demais tratados. Em relação à Noggin, no grupo LG Flutamida, temos aumento de sua expressão ($p < 0,05$), enquanto nos demais grupos tratados não houve mudanças significativas de expressão. Não houve mudanças significativas de expressão do BMP-4 em nenhum dos grupos tratados. Já em relação a Id-1 temos aumento de sua expressão no grupo LG Decadurabolin, enquanto nos grupos LG Flutamida e LG Flutamida+testosterona endógena temos diminuição de sua expressão ($p < 0,05$).

Quadro 13- Quantificação das expressões relativas e nível de significância dos genes da via do BMP para o grupo LG salina e demais grupos tratados. Em lilás: $p < 0,01$. Em azul: $p < 0,05$.

Gene	LG Salina	QR	LG Decadurabolin	QR	LG Flutamida	QR	LG Flutamida+testosterona endógena	QR
Noggin	LG7	-0,62343	LG1	-0,84439	LG13	-0,31939	LG19	-0,44552
	LG8	-0,87961	LG2	-0,40790	LG14	-0,27635	LG20	-0,66528
	LG9	-0,59664	LG3	-0,59965	LG15	-0,45154	LG21	-0,03010
	LG10	-0,55028	LG4	-0,72909			LG22	-0,97564
	LG11	-0,73090	LG5	-0,54667			LG23	-0,61199
	LG12	-0,71525	LG6	-0,44282			LG24	-0,55570
	Média	-0,68269	Média	-0,59509	Média	-0,34909	Média	-0,54737
	DP	0,10848	DP	0,15313	DP	0,07454	DP	0,28270
	Mediana	-0,66934	Mediana	-0,57316	Mediana	-0,31939	Mediana	-0,58385
			P	0,2980	P	0,0282	P	0,3785
BMP-4	LG7	0,46389	LG1	0,27273	LG13	0,11951	LG19	0,12884
	LG8	0,36665	LG2	0,54276	LG14	0,58069	LG20	0,00421
	LG9	0,18182	LG3	0,13336	LG15	0,45546	LG21	0,14931
	LG10	0,28568	LG4	0,08068			LG22	-0,11800
	LG11	-0,03582	LG5	0,69086			LG23	0,27905
	LG12	0,27002	LG6	0,34227			LG24	0,19025
	Média	0,25537	Média	0,34378	Média	0,38522	Média	0,10561
	DP	0,15663	DP	0,21549	DP	0,19472	DP	0,12909
	Mediana	0,27785	Mediana	0,30750	Mediana	0,45546	Mediana	0,13908
			P	0,6889	P	0,5186	P	0,1282
Id-1	LG7	-0,14630	LG1	0,46539	LG13	-1,99733	LG19	-2,29927
	LG8	-1,33988	LG2	-0,37508	LG14	-1,97325	LG20	-2,55153
	LG9	-0,67220	LG3	-0,09422	LG15	-1,48257	LG21	-2,36911
	LG10	-0,49038	LG4	-0,70862			LG22	-2,72252
	LG11	-1,45879	LG5	0,20079			LG23	-2,04911
	LG12	-0,54035	LG6	-0,08068			LG24	-2,30438
	Média	-0,77465	Média	-0,09874	Média	-1,81772	Média	-2,38265
	DP	0,47056	DP	0,37785	DP	0,23719	DP	0,21156
	Mediana	-0,60627	Mediana	-0,08745	Mediana	-1,97325	Mediana	-2,33675
			P	0,0453	P	0,0282	P	0,0051

Fonte: Santos (2012).

Figura 37- Valores individuais da quantificação das expressões relativas dos genes da via do BMP no grupo controle (LG salina) e nos diferentes grupos experimentais. Em vermelho, a mediana de cada grupo (* = $p < 0,05$).

Fonte: Santos (2012).

Figura 38- Análise das vias do grupo LG salina comparado ao grupo *Wild-type* salina. Em vermelho: expressão aumentada. Em verde: expressão diminuída.

Fonte: Santos (2012).

Quando a análise foi realizada comparando-se os grupos tratados com o grupo LG não tratado, um número bem menor de genes diferencialmente expressos foi identificado. No quadro 14 temos $\log_2$ do *Fold Change*, ou seja, o quanto os genes encontram-se diferencialmente expressos.

As únicas vias com resultados relevantes envolve o grupo LG Decadurabolin. Neste grupo temos aumento na expressão dos genes precursores para colágeno e diminuição na expressão do gene da miosina, com aumento da expressão dos genes relacionados à síntese de colágeno (Fig.39, via 1). Níveis aumentados de troponina T são observados, além da presença do gene do receptor de andrógeno e MyoD (Fig.39, via 2).

Quadro 14- Análise de microarranjo de DNA no grupo LG Decadurabolin, mostrando os genes diferencialmente expressos em relação ao grupo LG não tratado.

Probe ID	Símbolo	Gene	Fold Change	$\log_2$ Fold Change
10362495	Col10a1	<i>collagen, type X, alpha 1</i>	3,2573	1,7037
10424140	Col14a1	<i>collagen, type XIV, alpha 1</i>	2,2892	1,1949
10559547	Tnnt1	<i>troponin T1, skeletal, slow</i>	2,0606	1,0431

Fonte: Santos (2012).

Figura 39- Análise das vias do grupo LG Decadurabolin comparado ao grupo LG não tratado, vias 1 e 2, com genes do receptor de Activina IC, Smad2, receptor de andrógeno, MyoD (via 1) e miosina (via 2) circulados. Em vermelho: expressão aumentada. Em verde: expressão diminuída.

Fonte: Santos (2012).

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos do esteróides anabolizantes no músculo normal

O quadro 15 apresenta um resumo esquemático dos resultados obtidos quanto à variação do peso corpóreo, do diâmetro das fibras, e das quantificações relativas dos diferentes genes estudados.

Quadro 15- Resumo dos resultados obtidos, comparado os grupos experimentais ao controle (grupo salina). Seta verde: sem diferenças significativas. Seta azul: aumento significativo ($p<0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p<0,05$).

		Grupo			
		D	F	FD	FE
Genes/Vias	Peso corpóreo	↑		↑	↔
	Diâmetro da fibra	↔	↓	↔	↓
	Miostatina	↔			
	MyoD	↓	↑	↔	↑
	Myf-5	↓	↔	↓	↓
	Miogenina	↓	↑	↓	↑
	BMP-4	↔	↓	↔	↓
	Noggin	↔	↔	↔	↔
	Id-1	↔	↓	↓	↔

Fonte: Santos (2012).

Faz-se importante ressaltar a hipótese desta tese, para poder justificar as vias e genes estudados. A hipótese esquemática é:

Andrógeno/esteróide → Bloqueio da expressão da miostatina → ↑ Massa muscular

Podemos observar que apenas os animais que receberam esteróide em dose supra-fisiológica, isoladamente (grupo D) ou após tratamento com Flutamida (grupo FD) apresentaram aumento do peso corpóreo (quadro 15). Resultados semelhantes foram obtidos por Üstünel, Akkoyunlu e Demir (2010), que observaram aumento do peso corpóreo em ratos machos recebendo injeções subcutâneas de testosterona (4 injeções em intervalos quinzenais), na dose de 4 mg/Kg. Nós utilizamos uma dose bem maior, visto que em estudo preliminar, esta mesma dose não levou a aumento no peso dos camundongos. Na dose utilizada de 2,5 mg de esteróide/animal (~80 mg/kg) em injeções intraperitoneais semanais (5 injeções), atingimos resultados semelhantes aos obtidos nos ratos. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Gebhardt e Pancherz (2003), que observaram em ratos aumento de

aproximadamente 18% de seu peso inicial, quando estes animais receberam, com a idade de 4 meses, 1 mg/kg/semana de decanoato de nandrolona (Decadurabolin), durante 12 semanas. Portanto, a resposta do esteróide anabolizante não parece ter sido influenciada pelo tipo de esteróide ou pela via de administração, mas a dose pode variar nos diferentes estudos.

Apesar do aumento no peso observado nos animais dos grupos D e FD, não observamos aumento no diâmetro das fibras (quadro 15). Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Axell et al. (2006), onde animais C57BL, de 2 meses de idade, receberam um implante intraperitoneal de testosterona (11 ± 3 mg de testosterona) e com ele permaneceram durante 10 semanas; quando comparados com um grupo controle, que recebeu implante peritoneal, sem testosterona, o grupo tratado não apresentou diferença na área de secção transversa do músculo sóleo.

Nestes dois grupos com aumento do peso corpóreo não detectamos alteração na expressão da miostatina que poderia justificar o estímulo ao crescimento muscular. Nestes grupos também observamos uma redução na expressão dos genes da cascata de regeneração (MyoD, Myf-5 e miogenina). A via do BMP poderia ser uma alternativa para promoção de proliferação celular e crescimento muscular. Esta via compete com a da miostatina, e poderia ser responsável pelo aumento do peso observado nos grupos D e FD. Entretanto, a expressão dos genes da via do BMP (Noggin, BMP-4 e Id-1) não apresentaram mudanças (quadro 15).

Nos estudos de *Microarray*, observamos aumento de expressão de genes das cascatas que resultam em aumento na síntese da miosina e troponina T na fibra muscular, mas somente no grupo D (Fig.24, via 2). Estes resultados de *Microarray* estão de acordo com Qin et al. (2010), que utilizaram nandrolona em animais normais denervados, a fim prevenir o processo atrofico, e observaram que sua administração aumentava em cerca de 10 vezes a expressão da galanina e dobrava a expressão do gene da tropomiosina 3 gama, que são genes ligados a contração muscular.

Sabe-se que os esteróides, no caso o decanoato de nandrolona, causam retenção hídrica, hepatomegalia e aumento de rins. Karbalay-Doust et al. (2009) observaram aumento no peso do fígado em camundongos normais na ordem de 1% do peso total, enquanto Hoseini et al. (2009) observaram aumento do peso dos rins na ordem de 0,2%. Em nossos experimentos, o aumento do peso nos grupos D e FD foi de 5,20 g e 5,26 g, respectivamente (Tab.2), o que corresponde a cerca de 20% do peso original. Portanto o aumento do peso corpóreo nestes grupos não se justificaria apenas pelo aumento no peso destes órgãos, mas poderia haver uma associação entre o aumento dos órgãos e retenção líquida. Allouh e Rosser

(2010) realizaram estudos em galinhas, utilizando a dose de 25 mg/kg de decanoato de nandrolona (Decadurabolin), em injeções intramusculares semanais (4 injeções), e observaram aumento no peso do músculo peitoral de aproximadamente 8 g, que corresponde a um incremento de 15% no peso total do músculo (53 g aproximadamente), porém sem aumento significativo no peso o. Este fato demonstra a especificidade da ação dos esteróides anabolizantes em aumentar, preponderantemente a massa muscular, sendo os aumentos de órgãos e a retenção hídrica desprezíveis. Page et al. (2005) não observaram aumento do peso o em homens idosos, recebendo aproximadamente 2mg/kg de testosterona em injeções quinzenais, durante 3 anos. Porém estes autores observaram diminuição da porcentagem total de gordura corpórea nestes indivíduos de 5% e aumento de sua massa magra (que inclui a massa muscular) de mesma ordem. Estes autores observaram também nos indivíduos tratados níveis séricos baixos de leptina (em 6, 12, 24 e 36 meses do experimento), coerentes com a menor concentração de gordura após a administração da testosterona nos indivíduos, pois a concentração sérica de leptina é diretamente proporcional à energia armazenada no tecido adiposo, ou seja, de sua quantidade no organismo. Este mesmo resultado foi encontrado nos animais dos grupos D e FD (quadro 7), quando observamos os experimentos de *Microarray*, onde a expressão dos genes da leptina encontra-se reduzida, em relação aos controles normais recebendo salina (grupo S), indicando a diminuição do tecido adiposo nos camundongos do nosso estudo. Portanto os estudos de Allouh e Rosser (2010) e Page et al. (2005) indicam que o aumento do peso nos grupos D e FD poderia não estar relacionado ao aumento do tecido adiposo.

Devemos chamar a atenção de que a avaliação da expressão relativa dos genes de interesse foi realizada após 35 dias de tratamento, o que permitiu verificar o aumento de massa muscular. Estes resultados não invalidam a possibilidade de um aumento na expressão destes genes, em um estágio mais precoce do processo. Isto de fato foi evidenciado em um estudo realizado por Diel et al. (2008) em células C2C12, comparando esta linhagem celular em diferenciação, sem e com tratamento com diidrotestosterona. Os autores observaram que o tratamento com a diidrotestosterona diminuiu a expressão da miostatina no quarto dia após a exposição das células ao esteróide, fato que demonstra que a diminuição da expressão da miostatina ocorre precocemente. Estudo realizado por Shepard et al. (2011) utilizando em células C2C12 demonstrou que o aumento da expressão da miogenina e a diminuição na expressão de miostatina ocorrem em até cinco dias após estas células terem contato com a testosterona. Fu et al. (2011) observaram que a expressão da miogenina aumenta

gradativamente até o quarto dia pós-exposição das células L6 de ratos a testosterona, declinando em seguida e que este aumento é proporcional a concentração de testosterona utilizada, confirmando ainda mais a hipótese de que o esteróide anabolizante em nosso estudo estaria estimulando a cascata de regeneração precocemente. Brown et al. (2009) observaram que camundongos C57BL tratados com implante subcutâneo de testosterona, na dose suprafisiológica (que gerou uma concentração sérica de 21 ng/mL), quando comparados a um grupo tratado com salina (concentração sérica da testosterona de aproximadamente 0,60 ng/mL), apresentavam aumento da marcação para miogenina no gastrocnêmio após duas semanas de tratamento, ou seja, aumento precoce de sua expressão após o tratamento com esteróide anabolizante. O incremento de massa do grupo D, ao final do experimento, deveu-se a um aumento da deposição de proteína na fibra muscular, como a miosina e troponina T, porém sem hipertrofia. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Chambon et al. (2010), que propõe um mecanismo diferente de ação dos esteróides anabolizantes nas fibras musculares nos músculos dos membros e no músculo perineal; nos membros pode não ocorrer hipertrofia, fato que sugere que o esteróide esteja atuando sobre o receptor de andrógeno (RA) da fibra muscular, e que o RA estaria modulando a manutenção do aparelho contrátil muscular, para a manutenção da força muscular, sem ou com estímulo precoce às CS e/ou produção de IGF-1 (Fig.40). Em relação à IGF-1 Gebhardt e Pancherz (2003) observaram em ratos, com a idade de 4 meses, tratados com 1 mg/kg de nandrolona, aumento de 60% na concentração sérica de IGF-1, porém com declínio de 50% abaixo do nível basal entre a terceira e quarta semanas, mantendo-se assim até o final da décima semana do experimento. Portanto o estímulo às células-satélites, a partir de IGF-1 ocorre precocemente, o que justificaria a baixa expressão dos genes da cascata de regeneração em nosso experimento.

Figura 40- Mecanismos de ação dos andrógenos nos músculos perineais e dos membros.

Fonte: Chambon et al. (2010).

Nos animais que foram suplementados com esteróide após a Flutamida (grupo FD) não observamos hipertrofia quando comparados ao controle (quadro 15), porém não podemos desconsiderar a possibilidade de uma hipertrofia compensatória à atrofia que ocorre devido ao tratamento prévio com Flutamida. Esta hipertrofia compensatória deveu-se a um provável estímulo às células-satélites (CS) proliferarem e este estímulo pode ser oriundo de algum dano à fibra muscular, ocasionado pelo bloqueio do receptor de andrógeno pela Flutamida. Isto é reforçado pelo estudo realizado por Chambon et al. (2010), que observaram que na ausência do receptor de andrógeno (RA) na fibra muscular de camundongos não distróficos acarretou alterações na organização miofibrilar, como diminuição dos miofilamentos, ruptura da linha Z, aumento do sarcoplasma e diminuição na capacidade do músculo em produzir força. Este dano a fibra muscular provavelmente ativou as CS a deixarem seu estado quiescente, entrarem no ciclo celular e aumentarem a expressão de MyoD e Myf-5, fato confirmado, no nosso estudo, pelo aumento da expressão relativa dos genes da cascata de regeneração do grupo F, que recebeu Flutamida durante 35 dias e foi sacrificado ao final deste período. Com a interrupção da Flutamida houve o desbloqueio dos receptores de andrógeno das CS e da fibra muscular, e desta forma o esteróide pode, respectivamente, estimular ainda mais proliferação das CS e manter a integridade do aparelho contrátil e da massa muscular adquirida com a hipertrofia, como descrito na figura 40. Estudos feitos por Ibebunjo et al. (2010) observaram que em ratos sedentários suplementados com testosterona (dose de 10 mg/kg) durante 28 dias,

pós 7 dias de orquiectomia (castração), apresentaram aumento da expressão, no músculo tríceps braquial, de IGF-1 e de seu receptor na fibra muscular, quando comparado ao controle da mesma idade. IGF-1 tem a capacidade de estimular a via do Akt-mTOR e aumentar a síntese de proteína, fato constatado pelo autor nestes animais. Neste experimento teríamos uma condição semelhante ao nosso grupo experimental FD, ou seja, a Flutamida simularia a orquiectomia por bloquear o receptor de andrógeno e explicaria o aumento do peso corpóreo e uma atrofia menos pronunciada (Fig.20).

Nos animais que receberam apenas Flutamida durante 35 dias (grupos F, FD e FE), observamos diminuição de seu peso corpóreo, enquanto no grupo FE, onde os animais estiveram sob a ação da testosterona endógena após a Flutamida, o peso permaneceu inalterado. Esta diminuição no peso corpóreo nestes animais pode ser explicada pelo bloqueio do receptor de andrógeno, ou seja, a testosterona testicular, entre outros andrógenos, ficaria impossibilitada de ligar-se ao seu receptor (RA) para manter a integridade da fibra ou gerar hipertrofia, pelo estímulo à proliferação das células-satélites (Fig. 40).

No grupo F, composto por animais que receberam Flutamida por 35 dias e foram sacrificados após este período, observamos uma diminuição no diâmetro das fibras musculares, fato que sugere atrofia muscular (quadro 15). Esta atrofia pode ser explicada pelas alterações na organização miofibrilar, resultantes do bloqueio do RA pela Flutamida, como ruptura de miofibrilas e diminuição do seu número, e diminuição na capacidade do músculo em produzir força, como observado por Chambon et al. (2010). No grupo F observamos também a ativação dos genes da cascata de regeneração, como MyoD e Myf-5, que estimulam a proliferação das CS, fato que se justifica pelo possível dano a fibra muscular causados pelo bloqueio do RA pela Flutamida, citados por Chambon et al. (2010) em animais com ausência do RA em sua fibra muscular. Os genes da via do BMP, como BMP-4 e Id-1 estão pouco expressos e, portanto, esta via não parece participar do estímulo à proliferação das CS (quadro 15). A baixa expressão de Id-1 deveu-se, provavelmente, à competição com a miogenina, com expressão elevada no grupo F (ONO et al., 2010). Ibebunjo et al. (2010) observou aumento da expressão de MuRF-1 em ratos sedentários após 28 dias de castração e MuRF-1 é um dos genes pertencente a chamada “via da atrofia”. Como a Flutamida simularia o efeito de uma orquiectomia (castração), podemos sugerir que a estimulação dos genes da cascata de regeneração não foi suficiente para reverter a atrofia da fibra ou evitar, conseqüentemente, a perda de massa muscular estimulada por MuRF-1.

No grupo FE a manutenção do peso corpóreo deveu-se pela ação da testosterona endógena, pós Flutamida (quadro 15). A desestruturação sofrida pela fibra muscular, pelo bloqueio do receptor de andrógeno, resultou na diminuição do diâmetro da fibra (Chambon et al. 2010). Porém o coeficiente de variação destas fibras foi de 27,32% (Tab.3), um valor acima de 25%, que indica regeneração muscular. Esta tendência à regeneração muscular ficou evidenciada pelo aumento na expressão dos genes da cascata de regeneração e pela inibição da expressão da miostatina, ou seja, um estímulo à entrada das CS no ciclo celular, fato que pode ser explicado pelo dano causado pela fibra muscular na ausência da ação da testosterona testicular. Com a suspensão da Flutamida a testosterona endógena pode agir, estimulando ainda mais as CS (a partir de seus receptores de andrógenos desbloqueados), já estimuladas a proliferar pela ação de MyoD e Myf-5, cuja expressão estava elevada devido ao tratamento prévio com Flutamida. Os genes da via do BMP estão com sua expressão praticamente inalterada, ou seja, a miogenina também está competindo com Id-1 (ONO et al., 2010). A baixa expressão da miostatina deveu-se a ação da testosterona endógena na fibra muscular (quadro 15). Mendler et al. (2007) observaram diminuição da expressão da miostatina após suplementação da testosterona, na dose diária de 1mg/kg, durante 30 dias, em animais castrados aos 4 meses. Esta diminuição na expressão da miostatina pode ser explicada por um mecanismo de *feedback* negativo entre miostatina e andrógeno, pois a miostatina menos expressa estimula a expressão de ARA70, um co-ativador do RA, ou seja, ARA facilita a ação dos andrógenos/esteróides no receptor de andrógeno. Com a diminuição da expressão da miostatina temos o estímulo às células-satélites entrarem no ciclo celular e, assim, todo o processo de regeneração estaria estimulado. Como a baixa expressão de miostatina e o aumento na expressão de ARA70 e a supressão do bloqueio do receptor de andrógeno, a testosterona endógena pode ligar-se sem impedimentos no seu receptor, estimulando mecanismos de aumento de síntese protéica pela atuação do IGF-1 (CHAMBON et al., 2010; WANG; MCPHERRON, 2012; MENDLER et al., 2007). A menor expressão da miostatina tem com consequências a ativação da via do Notch, que é uma das vias responsáveis pela ativação e proliferação das células-satélite (CS) e a diminuição da expressão de p21, um inibidor do ciclo celular, fatores que também favoreceram a hipertrofia (KOVACHEVA et al., 2010). Ou seja, há o estímulo ao processo hipertrófico para compensar a atrofia causada pela Flutamida, porém este não foi suficiente para evitar a atrofia da fibra muscular.

Os grupos que receberam esteróide (D e FD) ou naqueles que estiveram sob a ação da testosterona endógena (FE), apresentaram menor expressão do receptor de TGF-beta, mas

especificamente do receptor de Activina IC no *Microarray* (Fig. 24 e 25). Estes resultados podem ser explicados pela propriedade dos esteróides anabolizantes, a partir do receptor de andrógeno (RA), inibirem a expressão dos receptores dos membros da família do TGF-beta (GROSSE; BARTSCH; BANIAHMAD, 2012).

5.2 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico

A primeira análise realizada comparou os resultados observados nos grupos controle. O grupo LG salina, que recebeu salina semanalmente e foi avaliado funcionalmente, no início e final do experimento, foi comparado ao grupo *Wild-type* salina (tratado nas mesmas condições do grupo LG salina) e com outro grupo de animais *Large^{myd}*, que não foi submetido a nenhum procedimento (injeções ou avaliações funcionais), que recebeu o nome de grupo LG não tratado. Os resultados estão sumarizados no quadro 16.

Quadro16- Resumo dos resultados obtidos no experimento 2, comparando o grupo LG salina com os outros grupos controle (*Wild-type* salina e LG não tratado). Seta verde: sem diferenças significantes; seta azul: aumento significativo ($p < 0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p < 0,05$).

		Wild-type salina	LG não tratado
Análises	Peso corpóreo	↔	
	Diâmetro da fibra	↓	
	GD		
	GT	↔	
	RMA		
	REQM		
Genes	Miostatina	↔	
	MyoD	↑	
	Myf-5		
	Miogenina		
	Noggin	↓	↔
	BMP-4	↔	↔
	Id-1	↔	↑

Fonte: Santos (2012).

Independente do tratamento realizado, os animais *Large^{myd}* são menores em todas as fases do experimento (Tab.4), mas o seu crescimento é proporcional ao observado no animal normal. O diâmetro de suas fibras musculares também é menor (quadro 16).

Como os resultados de variação do peso corpóreo foram muito similares entre o grupo *Wild-type* salina e LG salina e a expressão do gene da miostatina também foi semelhante nos três grupos controle, decidimos realizar as comparações dos grupos experimentais com o grupo LG salina (quadro 17).

Quadro17- Resumo dos resultados obtidos no experimento 2, comparando o grupo LG salina com os demais grupos experimentais. Seta verde: sem diferenças significantes; seta azul: aumento significativo ($p<0,05$); seta vermelha: diminuição significativa ($p<0,05$).

		Grupo		
		LG Decadurabolin	LG Flutamida	LG Flutamida+testosterona endógena
Av. funcionais	Peso corpóreo	↑	↔	↔
	Diâmetro da fibra	↔	↑	↑
	GD	↑	↔	
	GT	↑		
	RMA	↔		
	REQM	↔		
Genes/vias	Miostatina	↔	↓	↔
	MyoD	↓	↓	↓
	Myf-5	↔	↓	↓
	Miogenina	↓	↓	↓
	Noggin	↔	↑	↔
	BMP-4	↔	↔	↔
	Id-1	↑	↓	↓

Fonte: Santos (2012).

Faz-se importante ressaltar, novamente, a hipótese desta tese, para poder justificar as vias e genes estudados. A hipótese esquemática é:

O grupo LG salina quando comparado ao grupo *Wild-type* salina (quadro 16) não apresentou aumento em sua massa corpórea, ou seja, o exercício não parece induzir hipertrofia nas fibras. Comparando-se o diâmetro das fibras musculares, temos diminuição do diâmetro das fibras no grupo LG salina, o que caracteriza o processo de regeneração muscular presente no processo distrófico (ONOFRE-OLIVEIRA et al., 2012).

Os resultados obtidos na expressão da cascata de regeneração, quando o grupo LG salina é comparado aos grupos *Wild-type* salina e LG não tratado, mostram que a regeneração está naturalmente ativada pelo processo distrófico do modelo *Large^{myd}* (YABLONKA-REUVENI et al., 2008) e As avaliações funcionais parecem aumentar o estímulo à

regeneração muscular (quadro 16). O efeito das injeções pode ser considerado irrelevante, pois o grupo *Wild-type* salina não apresentou alterações na expressão dos genes da cascata de regeneração (quadro 16).

O grupo LG Decadurabolin, que recebeu somente esteróide anabolizante, quando comparado ao grupo LG salina (quadro 17), apresentou aumento significativo do peso corpóreo, mesmo na presença do quadro distrófico, porém não há alteração no diâmetro das fibras com uso do esteróide. Quando observamos a expressão dos genes da cascata de regeneração e de Id-1 (via do BMP) observamos diminuição na expressão de MyoD e Myf-5 e aumento na expressão de Id-1. O aumento na expressão de Id-1 deveu-se à diminuição da expressão da miogenina, que compete com Id-1 (ONO et al., 2010). O esteróide parece diminuir o estímulo à regeneração, presente naturalmente no processo distrófico e não exacerbado pelas avaliações funcionais e injeções de salina, como observado nas comparações com os grupos *Wild-type* salina e LG não tratado (quadro 16), ou o estímulo aos genes da cascata de regeneração é precoce, como ocorre em células C2C12, onde o aumento da expressão da miogenina e a diminuição na expressão de miostatina ocorrem em até cinco dias após estas células terem contato com a testosterona (SHEPARD et al., 2011). Ainda sobre a expressão precoce dos genes da cascata de regeneração, Fu et al. (2011) observaram que a expressão da miogenina aumenta gradativamente até o quarto dia pós-exposição das células L6 de ratos a testosterona, declinando em seguida e que este aumento é proporcional a concentração de testosterona utilizada, confirmando ainda mais a hipótese de que o esteróide anabolizante em nosso estudo estaria estimulando a cascata de regeneração precocemente. Nos estudos de *Microarray* observamos aumento de expressão de genes que, atuando conjuntamente, levam ao aumento na síntese troponina T na fibra muscular (Fig.39, via 2). Estes resultados de *Microarray* estão de acordo com Qin et al. (2010), que utilizaram nandrolona em animais denervados, a fim prevenir o processo atrófico, e observaram que sua administração aumentou em 10 vezes a expressão do gene da galanina e em 2 vezes expressão do gene da tropomiosina 3 gama, genes ligados à contração muscular. Os resultados encontrados por Qin et al. (2010) poderiam explicar o fato da miostatina não apresentar sua expressão alterada, quando comparado ao grupo LG salina, ou seja, o esteróide parece priorizar o estímulo a vias que aumentam a deposição de proteína na fibra muscular e não daqueles relacionados ao estímulo/bloqueio à proliferação celular. Observamos também no *Microarray* (Fig.39, via 1) aumento na expressão dos genes ligados a síntese de colágeno, que mostraria uma exacerbação do processo de degeneração muscular, como observado por

Onofre-Oliveira et al. (2012). Os resultados dos *Microarrays* explicariam o aumento de massa no grupo LG Decadurabolin, pelo aumento de deposição de proteína muscular (troponina T) e de colágeno. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em por Chambon et al. (2010) em camundongos normais, que propõe um mecanismo diferente de ação dos esteróides anabolizantes nas fibras musculares dos músculos dos membros e no músculo perineal; nos membros pode não ocorrer hipertrofia, fato que sugere que o esteróide esteja atuando sobre o receptor de andrógeno (RA) da fibra muscular, e que o RA estaria modulando a manutenção do aparelho contrátil muscular, para a manutenção da força muscular, sem estímulo às CS e/ou produção de IGF-1 (Fig.40). Sabe-se que os esteroides anabolizantes, no caso o decanoato de nandrolona, causam retenção hídrica, hepatomegalia e aumento de rins. Karbalay-Doust et al. (2009) observaram aumento de peso do fígado em camundongos normais na ordem de 1% do peso total, enquanto Hoseini et al. (2009) observaram aumento de peso dos rins na ordem de 0,2%. Em nossos experimentos, o aumento de peso do grupo LG Decadurabolin foi de 3,79 g (Tab.5), que corresponde a cerca de 13% da massa original. Portanto não se justificaria apenas pelo aumento no peso destes órgãos, mas poderia haver uma associação entre o aumento dos órgãos e retenção hídrica. Allouh e Rosser (2010) realizaram estudos em galinhas, utilizando a dose de 25 mg/kg de decanoato de nandrolona (Decadurabolin), em injeções intramusculares semanais (4 injeções), observaram aumento na massa do músculo peitoral de aproximadamente 8g, que corresponde a um incremento de 15% na massa total do músculo (53g aproximadamente), porém sem aumento significativo da massa corpórea. Este fato demonstra a especificidade da ação dos esteróides anabolizantes em aumentar, preponderantemente a massa muscular, sendo os aumentos de órgãos e a retenção hídrica desprezíveis no aumento total da massa corpórea.

Nos grupos que foram tratados com Flutamida durante 35 dias (grupos LG Flutamida e LG Flutamida+testosterona endógena), não observamos aumento do peso em comparação ao grupo LG salina (quadro 17).

No grupo LG Flutamida, que recebeu Flutamida durante 35 dias e foi sacrificado em seguida, há o aumento no diâmetro das fibras, sugestivo de hipertrofia, porém não com magnitude suficiente para impactar no peso, como observado nos animais que receberam esteróide (grupo LG Decadurabolin) (quadro 17). Chambon et al. (2010) observaram que a ausência de receptor de andrógeno na fibra muscular, de camundongos normais, acarreta alterações na organização miofibrilar, como ruptura de miofibrilas e diminuição do seu número, além da diminuição na capacidade do músculo em produzir força. Porém este

possível dano causado pelo bloqueio do receptor de andrógeno pela Flutamida, estimularia ainda mais os genes da cascata de regeneração, já ativados pelo processo distrófico, somado as avaliações funcionais e injeções recebidas (quadro 16), a se ativarem ainda mais e estimularem a proliferação das células-satélites. Porém este estímulo a expressão de MyoD e Myf-5 deve ter diminuído até o momento do sacrifício dos animais, com 35 dias, impossibilitando sua detecção no PCR em tempo real. A diminuição da expressão de Id-1 neste grupo sugere estímulo á diferenciação celular, fato pertinente com o processo de hipertrofia observado e com a expressão aumentada de Noggin e não alterada de BMP-4, já que Noggin antagoniza a ligação do BMP-4 ao seu receptor no sarcolema (ONO et al., 2010). A expressão da miostatina encontra-se diminuída neste grupo, em relação ao grupo LG salina (quadro 17). Sabe-se que nas distrofias musculares a expressão da miostatina encontra-se menor, em resposta ao dano muscular (GOTLIEB, 2011), ou seja, a Flutamida de alguma forma está diminuindo ainda mais a expressão da miostatina. Provavelmente a menor expressão da miostatina é uma resposta ao bloqueio do receptor de andrógeno, com o intuito de aumentar a expressão de ARA70 (co-ativador do RA), a fim de melhorar o desempenho do RA, que encontra-se bloqueado, como descrito por Mendler et al. (2007).

No grupo que permaneceu sob a ação da testosterona endógena (Grupo LG Flutamida+testosterona endógena) temos resultados muito semelhantes aos encontrados na massa corpórea dos animais tratados com Flutamida durante 35 dias, ou seja, os animais não apresentam alteração em sua massa corpórea quando comparados ao grupo LG salina (quadro 17). A expressão relativa dos genes da cascata de regeneração e da via do BMP também é praticamente idêntica à observada no grupo F (tratado com Flutamida durante 35 dias e sacrificado após este período), porém não temos alteração da expressão da miostatina em relação aos animais do grupo LG salina (quadro 17). Como discutido anteriormente, a ativação da cascata de regeneração, naturalmente ativadas em processos distróficos, foi provavelmente mais ativada durante o início do tratamento com Flutamida, pela desestruturação das estruturas contráteis musculares (CHAMBON et al. , 2010). Estes animais apresentam hipertrofia, porém esta não possui magnitude para impactar de forma significativa no peso. O uso do esteróide anabolizante ou os andrógenos favorecem, inicialmente, o aumento na expressão dos genes da regeneração (SHEPARD et al., 2011), mas após este período a testosterona endógena passa a agir no sentido de manutenção da estrutura contrátil da musculatura, para conservar a hipertrofia já adquirida e manter a força muscular (Fig.40).

Nos estudos de *Microarray* não observamos nenhuma via de sinalização com a participação dos genes estudados nos grupos F e FE. Este resultado pode ser explicado pela magnitude do processo inflamatório no músculo distrófico. Quando comparamos os grupos LG não tratado com o *Wild type* salina observamos expressão aumentada de genes relacionados à inflamação, detectados pela técnica de *Microarray*, enquanto outros genes de menor expressão, como os relacionados com a regeneração muscular, não são detectados com o limiar utilizado na técnica.

Segundo Lopes (2010) os animais *Large^{myd}* nas provas de resistência nos membros anteriores (RMA) e resistência e equilíbrio nos quatro membros (REQM) apresentam desempenho pífio, quando comparados aos animais C57BL/6, e raramente permanecem suspensos na barra por mais de 10 segundos. Na prova do Grip Strength patas dianteiras (GD) e traseiras (GT) estes animais apresentam força absoluta menor, de aproximadamente metade da produzida pelo C57BL/6. Portanto, o camundongo *Large^{myd}* apresenta desempenho marcadamente inferior a um animal normal.

Houve aumento de força na avaliação funcional *Grip Strength* apenas nos animais do grupo LG Decadurabolin, ou seja, o aumento na massa melhorou o desempenho, apesar da ausência de hipertrofia, explicada pelo mecanismo de manutenção da estrutura contrátil do músculo pelo esteróide administrado (CHANBON et al., 2010). Outro fato que explicaria o aumento da força seria o aumento da presença da troponina T no músculo, evidenciada pelo *Microarray*. Porém o aumento na força causada pelo esteróide não foi suficiente para que o animal melhorasse o desempenho nas provas de RMA e REQM, ou seja, o animal ainda não consegue manter-se muito tempo sustentando o peso do próprio corpo.

Apesar da hipertrofia observada nos animais que receberam Flutamida durante 35 dias e naqueles sob a ação da testosterona endógena, após suspensão da Flutamida (grupo LG Flutamida+testosterona endógena), não observamos melhora no desempenho destes animais em nenhuma das avaliações funcionais, demonstrando que a hipertrofia não foi suficiente para impactar no desempenho das avaliações funcionais, porém o bloqueio do receptor de andrógeno não causou aparente prejuízo na capacidade funcional do músculo.

6 CONCLUSÕES

6.1 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo normal

Em relação aos efeitos dos esteróides anabolizantes, no músculo normal, podemos concluir que:

- a administração do esteróide anabolizante (grupos D e FD) aumenta o peso corpóreo, mas sem alteração no diâmetro das fibras musculares. Porém o aumento na massa não está relacionado ao bloqueio da via da miostatina. A cascata de regeneração encontra-se inibida.

Em relação ao músculo normal, sob a terapia com bloqueador do receptor de andrógeno, podemos concluir que:

- o bloqueio do receptor de andrógeno interrompe o crescimento normal do animal, mantendo a massa corpórea, por provável processo de atrofia da fibra muscular. Há ativação dos genes da cascata de regeneração, provavelmente como mecanismo compensatório à atrofia;
- em relação à via da miostatina, frente ao processo atrofico, temos seu bloqueio apenas quando há participação da testosterona endógena.

6.2 Efeitos dos esteróides anabolizantes no músculo distrófico

Em relação ao músculo distrófico, quando comparado ao músculo normal, podemos concluir que:

- independente do tratamento realizado, os animais *Large^{myd}* são menores em todas as fases do experimento, mas o seu crescimento é proporcional ao observado nos animais normais. O diâmetro de suas fibras musculares também é menor;
- a expressão do gene da miostatina, como observado no grupo LG não tratado, é menor em decorrência do processo distrófico, fato que indica que esta via esteja bloqueada;
- o exercício físico, isoladamente, aumenta a expressão de todos os genes da cascata de regeneração.

Em relação ao músculo distrófico, sob terapia com esteróides anabolizantes, podemos concluir que:

- a administração de esteróide anabolizante aumenta o peso corpóreo, mas não altera o diâmetro das fibras musculares. Porém este aumento não está relacionado ao bloqueio da via da miostatina, que se encontra menos inibida quando comparada aos animais LG não tratados;
- a cascata de regeneração, que já está ativada pelo processo distrófico, é reprimida sob a ação do esteróide anabolizante;
- o aumento do peso corpóreo melhora o desempenho dos camundongos nas provas de força, o que nos permite dizer que este aumento também está relacionado à massa muscular;
- os animais tratados com Decadurabolin melhoram o seu desempenho nas provas de força, fato que pode ou não estar relacionado ao aumento no peso.

Em relação ao músculo distrófico, sob a terapia com bloqueador do receptor de andrógeno, podemos concluir que:

- ❖ o bloqueio do receptor de andrógeno não altera o peso corpóreo, mas ocorre aumento no diâmetro das fibras musculares.
- ❖ a via da miostatina continua bloqueada, como observado no grupo LG não tratado. Não há ativação dos genes da cascata de regeneração ou da via do BMP, ou seja, a Flutamida não induziu processo regenerativo.
- ❖ o uso da Flutamida não altera o desempenho nas avaliações funcionais.

REFERÊNCIAS*

ALLOUH, M. Z.; ROSSER, B.W.C. Nandrolone decanoate increases satellite cell number in the chicken pectoralis muscle. **Histol. Histopathol.**, v. 25, n. 2, p. 133-140, 2010.

AMTHOR, H. et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. **PNAS**, v. 104, n. 6, p. 1835-1840, 2007.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Relative quantification**: Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System. Foster City: Applied Biosystems, 2004. 81 p.

AXELL, A. M. et al. Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, n. 3, p. E506-E516, 2006.

AXIONVISION Rel. Version.4.8.2. Mannheim: ZEISS. Software.

BARRESI, R. From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. **Skelet. Muscle**, v.1, n.24, p.1-15, 2001.

BERNARDI, H. et al. Wnt4 activates the canonical beta-catenina pathway and regulates negatively myostatin: functional implications in myogenesis. **Am. J. Physiol.**, v. 300, n. 5, p. C1122-C1138, 2011.

BLANCO, J. E.; ANDERSON, K. D.; STEWARD, O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. **Exp. Neurol.**, v. 203, n. 2, p. 333-348, 2007.

BOFF, S. R. A fibra muscular e fatores que interferem com o seu fenótipo. **Acta Fisiatr.**, v. 15, n. 2, p. 111-116, 2008.

BOGDANOVICH, S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. **Nature**, v. 420, n. 6914, p. 418-421, 2002.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O. B.; KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future direction. **J. Mol. Med.**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BROWN, D. et al. Mouse model of testosterone-induced muscle fiber hypertrophy: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated Notch signaling. **J. Endocrinol.**, v. 201, n. 1, p. 129-139, 2009.

BROWNING, C. A. et al. A rapid pcr method for genotyping the large^{myd} mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul. Disord.**, v. 15, n. 5, p. 331-335, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUBNOFF, A. V.; CHO, K. W. Y. Intracellular bmp signaling regulation in vertebrates: pathway or network. **Dev. Biol.**, v. 239, n. 1, p. 1-14, 2001.

BURDZINSKA, A.; GALA, K.; PACZEK, L. Myogenic stem cells. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 46, n. 4, p. 401-412, 2008

CAZZALINI, O. et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21^{CDK1A} in the dna damage. **Mutat. Res.**, v. 704, n. 1-3, p. 12-20, 2010.

CHAKKALAKAL, J. V. et al. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for duchenne/becker muscular dystrophies. **FASEB J.**, v. 19, n. 8, p. 880-891, 2005.

CHAMBARD, J. C. et al. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochim. Biophysica Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1299-1310, 2007.

CHAMBON, C. et al. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. **PNAS**, v. 107, n. 32, p. 14327-14332.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 1, p. 209-238, 2004.

CHEEK, D. B. The control of cell mass and replication: the dna unit-a personal 20 year study. **Early Hum. Dev.**, v. 12, n. 3, p. 211, 1985.

CHIAVEGATTO, S. et al. Functional role for complex gangliosides: motor deficits in gm2/gd2 synthase knockout mice. **Exp. Neurol.**, v. 166, n. 2, p. 227-234, 2000.

CIAVARRA, G.; HO, A. T.; COBRINIK, D.; ZACKSENHAUS, E. Critical role of the rb family in myoblasts survival and fusion. **PlosONE**, v. 6, n. 3, p. 1-14, 2011.

DEMLING, R. The use of anabolic agents in catabolic states. **J. Burns Wounds**, v. 6, p. 33-49, 2007.

DIEL, P. et al. C2C12 myoblastoma cell differentiation and proliferation is stimulated by androgens and associated with a modulation of myostatin and pax7 expression. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 40, n. 5, p. 231-241, 2008.

DUBOIS, V. et al. Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 69, n. 10, p. 1561-1567, 2012.

DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy- A practical approach. 3th ed. Philadelphia: Saunders, 2006. 626p.**

ELKINA, Y. et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **J. Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J. Cell. Biol.**, v. 122, n. 4, p. 809-823, 1993.

EXPRESSION CONSOLE Rel. Version. 1.2. Santa Clara: AFFYMETRIX. Software.

FALCO, G. D.; COMES, F.; SIMONE, C. pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5244-5249, 2006.

FELDMAN, B.J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.1, n.1, p.34-45, 2001.

FU et al. Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. **J. Cell. Physiol.**v.227, n.1, p.98-107, 2011.

GAO, W. et al. Selective androgen receptor modulator treatment improves muscle strength and body composition and prevents bone loss in orchidectomized rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4887-4897, 2005.

GAO, Y.; BOHL, C. E.; DALLON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 9, p. 3352-3370, 2007.

GARIKIPATI, D. K. et al. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (stmstn-2^a and -2b): genomic organization, differential expression, and pseudogenization. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2106-2115, 2007.

GEBHARDT, A.; PANCHERZ, H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 123, n. 4, p. 435-440, 2003.

GENTRY, B.A. et al. Hindlimb skeletal muscle function in myostatin-deficient mice. **Muscle Nerve**, v. 43, n. 1, p. 49-57, 2011.

GOTLIEB, D. Z. **Estudo da expressão da miostatina em modelos murinos para doenças neuromusculares**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. 79 p.

GREEN, D. J.; HAMRICK, M. W.; RICHMOND, B. G. The effects of hypermuscularity on shoulder morphology in myostatin-deficient mice. **J. Anat.**, v. 218, n. 5, p. 544-557, 2011.

GREWAL, P. K. et al. Mutant glycosyltransferase and altered glycosylation of α -dystroglycan in the myodystrophy mouse. **Nature**, v. 28, n. 2, p. 151-154, 2001.

GREWAL, P. K.; HEWITT, J. E. Glycosylation defects: a new mechanism for muscular dystrophy. **Human. Molecular Genetics**, v. 12, n. 2, p. 259-264, 2003.

GREWAL, P. K.; HEWITT, J. E. Mutation of *large*, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1573, n. 3, p. 216-224, 2002.

GROSSE, A.; BARTSCH, S.; BANIAHMAD, A. Androgen receptor-mediated gene repression. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 352, n. 1-2, p. 46-56, 2012.

GRUENEWALD, D. A.; MATSUMOTO, A. M. Testosterone supplementation therapy for older men: potential benefits and risks. **JAGS**, v. 51, p. 101-115, 2003.

GUYTON, A. C. **Textbook of medical physiology**. 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2006. 1264 p.

HAIDET, A. M. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. **PNAS**, v. 105, n. 11, p. 4318-4322, 2008.

HARVARD MEDICAL SCHOOL. **Primer bank**. Disponível em: <<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>>. Acesso em: 09 jun. 2012.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 2, p. 534-551, 2001.

HENEIKE, J. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. **Circulation**, v. 121, n. 3, p. 419-425, 2010.

HIKIM, S. I. et al. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy young men. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 1, p. E197-E205, 2003.

HIORT, O. Androgens and puberty. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Met.**, v. 16, n. 1, p. 31-41, 2002.

HIROKI, E. et al. A comparative study of myostatin, follistatin and decorin expression in muscle of different origin. **Anat. Sci. Int.**, v. 86, n. 3, p. 151-159, 2011.

HOSEINI, L. et al. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 226-230, 2009.

HUANG, Z.; CHEN, X.; CHEN, D. Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. **Cell Signal.**, v. 23, n. 9, p. 1441-1446, 2011.

HULMI, J. J.; KOVANEN, V.; LISKI, I.; SELANNE, H.; MERO, A. A. The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expression responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 102, p. 205-213, 2008.

IBEBUNJO, C. et al. Voluntary running, skeletal muscle gene expression, and signaling inversely regulated by orchiectomy and testosterone replacement. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 300, n. 2, p. E327-E340, 2011.

IPA. Redwood City: INGENUITY SYSTEM. Software.

INOUE et al. Androgen receptor antagonist suppresses exercise-induced hypertrophy of skeletal muscle. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 69, n. 1, p. 88-91, 1994.

JOHNSON, G.B.; RAVEN, P.H. **Biology**. 6th. New York: McGraw Hill, 2002. 1239 p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KADI, F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. **Br. J. Pharmacol.**, v. 154, n. 3, p. 522-528, 2008.

KAN, W. H. et al. Flutamide protects against trauma-hemorrhage-induced liver injury via attenuation of the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis. **J. Appl. Physiol.**, v. 105, n. 2, p. 595-602, 2008.

KARBALAY-DOUST, S.; NOORAFSHAN, A. Stereological study of the effects of nandrolone decanoate on the mouse liver. **Micron**, v. 40, n. 4, p. 471-475, 2009.

KERR, J. M.; CONGENI, J. A. Anabolic-androgenic steroids: use and abuse in pediatric patients. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 54, n. 4, p. 771-785, 2007.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 379-390, 2003.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. **Br. J. Pharmacol.**, v. 154, n. 3, p. 502-521, 2008.

KITZMANN, M.; FERNANDEZ, A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor myod in skeletal myoblast. **CMLS**, v. 58, n. 4, p. 571-579, 2001.

KLOVER, P. et al. Skeletal muscle growth and fiber composition in mice are regulated through the transcription factors stat5a/b: linking growth hormone to the androgen receptor. **FASEB**, v. 23, n. 9, p. 3140-3148.

KOVACHEVA, E. L. et al. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-jun nh₂-terminal kinase, notch, and akt signaling pathways. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 628-638, 2010.

KRAUSE, C.; GUZMAN, A.; KNAUS, P. Noggin. **Int. J. Biochem.Cell Biol.**, v. 43, n. 4, p. 478-481, 2011.

KUHN, C. M. Anabolic Steroids. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 57, p. 411-434, 2002.

LANGLEY, B. et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by downregulating myod expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 51, p. 49831-49840, 2002.

LEE, N. K. L. et al. Ornithine decarboxylase is upregulated by the androgen receptor in skeletal muscle and regulates myoblast proliferation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 301, n. 1, p. E172-E179, 2011.

LEE, S. J. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type 1 receptors. **PNAS**, v. 102, n. 50, p. 18117-18122, 2005.

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

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **PNAS**, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.

LI, B. Z.; KOLLIAS, H. D.; WAGNER, K. R. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 28, p. 19371-19378, 2008.

LI, Z. et al. Administration of a mutated myostatin propeptide to neonatal mice significantly enhances skeletal muscle growth. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 77, n. 1, p. 76-82, 2010.

LIN, C. et al. Use of high-dose nandrolone aggravates septic shock in a mouse model. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v. 27, n. 6, p. 222-229, 2011.

LOPES, V. F. **Caracterização funcional das diferentes linhagens de modelos merinos para distrofias musculares.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010. 63p.

MANCEAU, M. et al. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. **Genes Dev.**, v. 22, n. 5, p. 668-681, 2007.

- MARGONI, A.; FOTIS, L.; PAPAVALASSILIOU, A. G. The transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signalling pathway in adipogenesis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 44, n. 3, p. 475-479, 2012.
- MARONA, R. N.; STORTI, M. P. B.; NETO, V. A. L. Flutamida: revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Ver. bras. cancerol.**, v. 50, n. 1, p. 37-44, 2004.
- MATSUMOTO, T. et al. Study of androgen receptor functions by genetic models. **J. Biochem.**, v. 138, n. 2, p. 105-110, 2005.
- MCLUNG, J. M. et al. Nandrolone decanoate modulates cell cycle regulation in functionally overloaded rat soleus muscle. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, n. 6, p. R1543-1552, 2005.
- MCPHERRON, A.; LAWLER, A.; LEE, S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new tgf-superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 34, p. 83-90, 1997.
- MENDLER, L. et al. Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 361, n. 1, p. 237-242, 2007.
- MICROARRAY SOFTWARE SUITE. Rel. Version. 4.8. Boston: TM4. Software.
- MIURA, T. et al. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 340, n. 2, p. 675-680, 2006.
- MOSHER, D. S. et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **Plos Genetic**, v. 3, n. 5, p. 779-786, 2007.
- MOYER, A. L.; WAGNER, K. R. Regeneration versus fibrosis in skeletal muscle. **Curr. Opin. Rheumatol.** , v. 23, n. 6, p. 568-573, 2011.
- MUNTONI, F. et al. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuromuscul. Disord.**, v. 12, n. 5, p. 438-446, 2001.
- MUNTONI, F. Mutations in the human large gene cause mdcl1d, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. **Hum. Mol. Genet.**, v. 12, n. 21, p. 2853-2861, 2003.
- MUNTONI, F.; VOIT, T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. Review. **Neuromuscul. Disord.**, v. 14, n. 10, p. 635-649, 2004.
- NICHOLAS, G. et al. Titin-cap associates with, and regulates secretion of myostatin. **J. Cell. Physiol.**, v. 193, n. 1, p. 120-131, 2002.
- OLDHAM, J. M. et al. Molecular expression of myostatin and myod is greater in double-muscle than normal-muscle cattle fetuses. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, n. 5, p. R1488-R1493, 2001.
- ONO, Y. et al. BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. **Cell. Death Differ.**, v. 18, n. 2, p. 222-234, 2010.

ONOFRE-OLIVEIRA, P.C. et al. Differential expression of genes involved in the degeneration and regeneration pathways in mouse models for muscular dystrophies. **Neuromol. Med.**, v. 14, n. 1, p. 74-83, 2012.

OZAWA, E. et al. Dystrophin, dystrophin-associated protein and dystrophinopathy Review. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v. 15, n. 3, p. 289-293, 1995.

PAGE, S. T. et al. Exogenous testosterone (t) alone or with finasteride increases physical performance, grip strenght, and lean body mass in older men with low serum t. **J. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 3, p. 1502-1510, 2005.

PALVIMO, J. J. Androgen receptor. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 352, n. 1-2, p. 1-3, 2012.

PARSON, S.A. Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. **Am. J. Pathol.**, v. 168, n. 6, p. 1975-1985, 2006.

PATEL, K.; AMTHOR, H. The function of myostatin and strategies of myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. **Neuromuscul. Disord.**, v. 15, n. 2, p. 117-126, 2005.

QIN, W. et al. Differential alterations in gene expression profiles contribute to time-dependent effects of nandrolone to prevent denervation atrophy. **BMC Genomics**, v. 11, n. 596, p. 1-17, 2010.

RADLEY, H. G.; DAVIES, M. J.; GROUNDS, M. D. Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cv1q (blockade of tnfr) treatment. **Neuromuscul. Disord.**, v. 18, n. 3, p. 227-238, 2008.

RECKELHOFF, J. F. et al. Testosterone supplementation in aging men and women: possible impact on cardiovascular-renal disease. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, n. 5, p. F941-F948, 2005.

ROTH, S. M.; MARTEL, G. F.; FERREL, R. E. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy resistance strength training: a brief communication. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, n. 6, p. 706-709, 2003.

SAKUMA, K.; WATANABE, K.; SANO, M. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1497, n. 1, p. 77-88, 2000.

SATO, T.; KAWANO, H.; KATO, S. Study of androgen action in bone by analysis of androgen-receptor deficient. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 20, n. 6, p. 326-330, 2002.

SCHNEIDER, J. W. et al. Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in rb -/- muscle cells. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1467-1471, 1994.

SCHUELKE, M. et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 26, p. 2682-2688, 2004.

SEILIEZ, I.; SABIN, N.; GABILLARD, J.C. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblast. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 351, n. 2, p. 220-226, 2012.

- SHARMA, M. et al. Myostatin in muscle growth and repair. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 29, n. 4, p. 155-158, 2001.
- SHEPARD, R. L. et al. Androgen receptor polyglutamine repeat length affects receptor activity and c2c12 cell development. **Physiol. Genomics**, v. 43, n. 20, p. 1135-1143, 2011.
- SHIN, D. H. et al. Constitutive overexpression of id-1 in mammary glands of transgenic mice results in precocious and increased formation of terminal end buds, enhanced alveologenesis, delayed involution. **J. Cell. Physiol.**, v. 226, n. 5, p.1340-1352, 2010.
- SINGH, R. et al. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in c3h 10t1/2 pluripotent cells through and androgen receptor-mediated pathway. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 5081-5088, 2003.
- SINGH, R. et al. Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ β -catenin and follistatin/transforming growth factor- β signaling pathways. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1259-1268, 2009.
- TAKEMOTO, R. C et al. Quantitative assessment of the bone morphogenetic protein expression from alternate bone graft harvesting sites. **J. Orthop. Trauma**, v. 24, n. 9, p. 564-566, 2010.
- THOMAS, M. et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.
- TORALDO, G. et al. Topical androgen antagonism promotes cutaneous wound healing without systemic androgen deprivation by blocking β -catenin nuclear translocation and cross-talk with tgf- β signaling in keratinocytes. **Wound Repair Regen.**, v. 20, n. 1, p. 61-73, 2012.
- TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces akt/torc1/p70S6k signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 296, n. 6, p. C1258-C1270, 2009.
- TSIVITSE, S. Notch and wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 268-281, 2010.
- ÜSTÜNEL, I.; AKKOYUNLU, G.; DEMIR, R. The effect of testosterone on gastrocnemius muscle fibres in growing and adult male and female rats: a histochemical, morphometric and ultrastructural study. **Anat. Histol. Embryol.** v. 32, n. 2, p.70-79, 2003.
- VAINZOF, M. et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **J. Mol. Neurosci.**, v. 34, n. 3, p. 241-248, 2008.
- VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 36, n. 5, p. 543-545, 2003.
- WAGERS, A. J.; CONBOY, I. M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 659-667, 2005.
- WAGNER, K. U.; SCHMIDT, J. W. The two faces of janus kinases and their respective stats in mammary gland development and cancer. **J. Carcinog.**, v. 10, n. 32, p. 50-59, 2011.
- WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 365, n. 1546, p. 1557-1569, 2010.

- WALSH, D. et al. Extracellular bmp-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. **Trends Cell Biol.**, v. 20, n. 5, p. 244-256, 2010.
- WALSH, F. S.; CELESTE, A. J. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, n. 6, p. 1513-1517, 2005.
- WANG, Q.; MCPHERRON, A.C. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. **J Physiol.**, v. 590, n. 9, p. 2151-2165, 2012.
- WATERS, F. J. et al. Use of pifithrin to inhibit p53-mediated signalling of tnf in dystrophic muscle of mdx mice. **Mol. Cell Biochem.**, v. 337, n. 1-2, p. 119-131, 2010.
- WHITTEMORE, L. A. et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strenght. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, n. 4, p. 965-971, 2003.
- WILSON, J. D. Androgênios. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 1996. p. 939-950.
- WONG, Y. C.; WANG, X.; LING, M. T. Id-1 expression and cell survival. **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 279-289, 2004.
- WU, C. T. et al. Androgen deprivation modulates the inflammatory response induced by irradiation. **BMC Cancer**, v. 92, n. 9, p. 1-10, 2009.
- WU, Y. et al. Nandrolone normalizes determinants of muscle mass and fiber type after SCI. **J. Neurotrauma**, v. 29, n. 8, p. 1663-1675, 2012.
- WU, Y. et al. Testosterone-induced hypertrophy of l6 myoblast is dependent upon erk and mtor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 400, n. 4, p. 679-683, 2010.
- YABLONKA-RAUVENI, Z.; DAY, K. Definiting the transcriptional signature os skeletal muscle stem-cells. **J. Anim. Sci.**, v. 86, n. 14, p. E207-E216, 2008.
- YOUNG, E. L.; LOY, C. J.; SIM, K. S. Androgen receptor gene and male infertility. **Human Reprod. Update**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2003.
- ZAMMIT, P. S. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? **J. Cell Sci.**, v. 21, n. 18, p. 2975-2982, 2008.
- ZHANG, C. et al. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the amp-activated protein kinase kinase signalling pathway. **Diabetologia**, v. 56, n. 6, p. 1491-1501, 2011.
- ZHANG, C. et al. Myostatin-null mice exhibit delayed skin wound healing through the blockade of transforming growth factor- β signaling by decorin. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 302, n. 8, p. C1213-C1225, 2012.
- ZHANG, T. et al. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 46, p. 8412-8416, 2011.
- ZHU, Y. S. Molecular basis of steroid action in the prostate. **Cellscience**, v. 4, n. 1, p. 27-55, 2005.