

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Ação da nandrolona no padrão energético do músculo esquelético
imobilizado: Estudo em ratos.

Adriano César Rocco Pardi

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ADRIANO CESAR ROCCO PARDI

AÇÃO DA NANDROLONA NO PADRÃO
ENERGÉTICO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO
IMOBILIZADO: ESTUDO EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA
2010

Ficha Catalográfica

Pardi, Adriano Cesar Rocco

Ação da nandrolona no padrão energético do músculo esquelético imobilizado: estudo em ratos. / Adriano Cesar Rocco Pardi - Piracicaba, 2009.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde - Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia / Universidade Metodista de Piracicaba.

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

1. Decanoato de Nandrolona. 2. Glicogênio. 3. Eletrocardiografia.
I. Pardi, Adriano Cesar Rocco. II. Título.

CDU:

Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia



Os membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de ADRIANO CESAR ROCCO PARDI, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em Sessão Pública realizada em 25 de fevereiro de 2011, consideraram o candidato aprovado.

BANCA EXAMINADORA

Mantida pelo Instituto Educacional Piracicabano

CAMPUS TAQUARAL – BLOCO 7

Rod. do Açúcar, Km 156 – Caixa Postal 68 – CEP 13400-911 – Piracicaba, SP

Fone (019) 3124-1558/ Fax 3124-1503 – Home Page: <http://www.unimep.br>

RESUMO:

Embora existam aplicações clínicas de esteróides anabólicos androgênicos (EAA), também há abuso generalizado destas substâncias por estarem relacionadas ao aumento da massa muscular e força. O uso indevido de EAA é um problema complexo, pois conduziu ao abuso destes compostos, a princípio por competidores de alto nível, alcançando também áreas de atividade física em geral. O objetivo deste trabalho foi investigar alterações bioquímicas e fisiológicas em músculos esqueléticos de ratos submetidos à imobilização tratados com decanoato de nandrolona (NA), com foco de análise nas reservas de glicogênio, suas relações químio-metabólicas e moleculares. Foi avaliado o efeito da NA sobre as reservas de glicogênio, a concentração de proteínas e análise molecular, em músculos de ratos desnervados. Uma análise do perfil eletrocardiográfico também acompanhou a análise. Foram utilizados ratos Wistar, divididos: grupo controle (C), controle tratado com nadrolona (0,7mg/Kg/semana, N7), controle tratado com o nadrolona (5mg/Kg/semana, N5), imobilizado (I), imobilizado tratado com nandrolona (0,7mg/Kg/semana, IN7) e imobilizado tratado com nandrolona (5mg/Kg/semana, IN5). O conteúdo de glicogênio foi analisado no ventrículo (V), fígado (F) e nos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e gastrocnêmio vermelho (GV), por meio do método fenol sulfúrico. Análise da proteína total foi realizada no S, pelo método colorimétrico, através de um kit laboratorial. Na análise biomolecular, foi utilizado o método Western Blot. Na análise estatística foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados mostraram que a dose 5mg/kg/semana de nandrolona comprometeu o perfil eletrocardiográfico e não demonstrou efeito benéfico para a musculatura imobilizada. Por outro lado, na dose 0,7mg/kg/semana a nandrolona promoveu melhora nas reservas glicogênicas dos músculos imobilizados além de exercer ação anti-catabólica onde expressa ação por duas vias, uma direta onde promoveu ação enquanto secretagogo e uma indireta a partir da ativação da via insulínica tecidual, condição em que promoveu a ativação das enzimas AKT e mTOR responsáveis pela manutenção das condições energéticas e da massa muscular. Conclusão: Nandrolona na dose de 0,7 mg/Kg/semana foi eficiente em prevenir os efeitos deletérios que acompanham o processo de desuso da musculatura esquelética, mantendo condições próximas ao músculo controle, sendo sugestivo sua utilização enquanto ferramenta farmacológica envolvida na preservação da homeostasia tecidual, fator facilitador da recuperação funcional.

Palavras chave: Nandrolona, imobilização muscular, glicogênio

Abstract

Although there are clinical applications of anabolic androgenic steroids (EEA), there is also widespread abuse of these substances because they are related to increased muscle mass and strength. The misuse of EEA is a complex problem, since it led to the abuse of these compounds, the principle of high level competitors, also reaching the areas of physical activity in general. The aim of this study was to investigate biochemical and physiological changes in skeletal muscles of rats subjected to immobilization treated with nandrolone decanoate (NA), focusing on analysis of glycogen stores, their relationships chemo-metabolic and molecular. The effect of NA on the reserves of glycogen, protein concentration and molecular analysis in denervated muscles of rats. An analysis of electrocardiographic profile also accompanied the analysis. Wistar rats were divided: the control group (C), control treated with nadrolona (0.7 mg/ kg/week, N7), control treated with nadrolona (5mg/kg/week, N5), immobilized (I), immobilized treated with nandrolone (0.7 mg/kg/week, IN7) and immobilized treated with nandrolone (5mg/kg/week, IN5). The glycogen content was analyzed in the ventricle (V), liver (F) and soleus (S), white gastrocnemius (WG) and red gastrocnemius (RG), using the phenol sulfuric method. Analysis of total protein was performed in S, the colorimetric method, using a laboratory kit. In biomolecular analysis, we used the Western blot method. Statistical analysis was applied the normality test of Kolmogorov-Smirnov test followed by post-Tukey test. The results showed that high doses of nandrolone committed the electrocardiographic profile and has shown no beneficial effect on the immobilized muscles. Moreover, the clinical dose nandrolone promoted improvement in the immobilized muscles of glycogen reserves in addition to exerting an anti-catabolic action which expresses two routes, one which promoted direct action as a secretagogue and indirectly from the activation of the insulin tissue condition that promoted the activation of AKT and mTOR enzyme responsible for maintaining the energy conditions and muscle mass. Conclusion: Nandrolone at a dose of 0.7 mg/kg/week was effective in preventing the deleterious effects that accompany the process of disuse of skeletal muscles, maintaining conditions close to the muscle control, which suggested their use as pharmacological tool involved in the preservation of homeostasis tissue, a factor that enhances the functional recovery.

Key words: nandrolone, immobilization, skeletal muscle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS	12
2. OBJETIVO	16
OBJETIVO GERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
ANIMAIS EXPERIMENTAIS	17
DESNERVAÇÃO	18
GLICOGÊNIO MUSCULAR	18
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	19
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	19
SUPLEMENTAÇÃO COM NANDROLONA	19
ELETROCARDIOGRAMA	19
SECREÇÃO DE INSULINA	20
AVALIAÇÃO MOLECULAR	21
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5. RESULTADOS	22
6. DISCUÇÃO	33
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS	40
9. ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares, doenças degenerativas, bem como as articulares, podem exigir, após cirurgia ou tratamento conservador, imobilização dos membros, comumente realizada por meio da aplicação de aparelho gessado (Halar e Kathleen, 2002).

Experimentalmente na literatura há trabalhos abordando os modelos de desuso muscular, como a denervação, tenotomia, suspensão de membro, repouso prolongado em leito e imobilização articular (Musacchia et al., 1988). Esses modelos de desuso se diferem quanto ao período, posição articular e material utilizado. Com relação à posição da articulação do tornozelo, podem ser encontrados trabalhos em flexão plantar ou em dorsiflexão para que os músculos sejam avaliados em posições de encurtamento, alongamento ou ainda posição neutra. Por outro lado, estudos que utilizaram a posição de 90° do tornozelo promovem concomitante imobilização das articulações do joelho e quadril.

A plasticidade histo-fisiológica das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de adaptar constantemente sua funcionalidade deflagrando mudanças no seu tamanho ou na tipagem. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque os modelos de desuso muscular, alterações hormonais, nutrição, estimulação elétrica neuromuscular, entre outros (Salvini, 2000; Polacow et al., 2003, Durigan et al., 2005).

Neste sentido, sabe-se que a hipotrofia muscular induzida por desuso ocorre em associação com desordens ortopédicas como na osteoartrite crônica, frente à imobilização no tratamento de fraturas, tratamento com glicocorticóides ou ainda em situações de manutenção por repouso prolongado. Assim, tem sido demonstrado que o desuso muscular induz uma gama de efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, atrofia muscular, redução da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (Reardon et al., 2001).

O desuso muscular crônico, produzido por condições de inatividade prolongada, imobilização do membro ou microgravidade, induz resistência à insulina, potencializando o estado catabólico em músculos esqueléticos de humanos e ratos, fibrose intramuscular, redução da extensibilidade muscular além de limitação da liberdade de movimento articular (Reardon et al., 2001).

Apesar do desuso muscular crônico e da imobilização ser condições que

diminuem a captação de glicose estimulada pela insulina, ainda não está claro o mecanismo pelo qual há alteração em suas vias sinalizadoras (Hirose et al., 2000). Tem sido relatado que a redução na atividade da junção neuromuscular provocada pela inatividade forçada ou desnervação muscular promove redução na efetividade das vias sinalizadoras da insulina, na população de GLUT 4 bem como na sua expressão gênica, comprometendo a homeostasia energética e acelerando o desenvolvimento do quadro de resistência à insulina (Fushiki et al., 1991; Zhang et al., 2007).

Recentemente foi relatado que concomitante a imobilização de membros posteriores de ratos utilizando órtese de acrílico, mantendo a articulação do tornozelo na posição de 90° houve redução no conteúdo de glicogênio, acompanhado por uma redução significativa na massa muscular, da área das fibras musculares e um aumento significativo da área ocupada pelo tecido conjuntivo (Durigan et al., 2005).

Nesse contexto, tem-se caracterizado a hipotrofia como um processo específico para cada tipo de músculo. Dessa maneira as fibras do tipo I possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II, sendo conseqüentemente mais afetadas pelo desuso. Em suma há consenso que os músculos cuja ação é anti-gravitacional possuem maior grau de hipotrofia em situações de desuso, há maior susceptibilidade à hipotrofia em fibras lentas oxidativas e o músculo sóleo apresenta o maior comprometimento nestas situações por ser predominantemente formado por fibras do tipo I ao passo que o extensor longo dos dedos que possui predomínio de fibras do tipo II é menos comprometido (Mercier et al., 1999, Chingui et al., 2008).

Nesse sentido tem se observado que as fibras lentas em situação de desuso apresentam marcantes alterações histo-fisiológicas como irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, como condensação e fragmentação da cromatina nuclear. Além de redução de sarcômeros em paralelo (Carson 1997; Tanaka et al., 2004).

Alguns estudos procuram elucidar as alterações metabólicas presentes na imobilização. Assim, Hilder et al., (2003), em um estudo realizado com suspensão de membros posteriores de ratos, foi demonstrado que a resistência à insulina acompanha o processo de atrofia muscular induzida pelo desuso em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo sóleo. Simultaneamente, esses autores observaram também uma redução na expressão de proteínas nos músculos

atrofiados e a correlacionaram à degradação da proteína IRS-1 (substrato do receptor de insulina), o que evidencia uma redução na efetividade da sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da AKT (faz parte de uma grande família de proteínas quinases B (PBK) (Testa e Bellacosa, 2001).

Diversos trabalhos evidenciam as perdas da massa muscular em períodos de imobilização (Dias et al., 2005, Pelizzari et al., 2008, Matheus et al., 2008). Ohira et al., (1999) observaram em ratos a implantação rápida da hipotrofia em um período de 7 e 10 dias de imobilização por suspensão, sendo evidenciado que após o 10º dia a perda de massa muscular ocorre com menor velocidade.

Vários modelos experimentais foram desenvolvidos para determinar as mudanças que ocorrem no músculo após um período de desuso, já que cada modelo possui características específicas. Historicamente, técnicas não invasivas e invasivas, como a desnervação, tenotomia e fixação da articulação por meio de pinos, fornecem a base para o conhecimento das alterações provocadas pelo desuso muscular. Dentre as técnicas invasivas, destaca-se a desnervação. Essa técnica é alcançada por meio de secção ou esmagamento do nervo, ou ainda por bloqueio químico, eliminando a comunicação do músculo com o nervo, impedindo a ocorrência de reflexos musculares (Musacchia et al., 1988, Marimuthu et al., 2010).

A imobilização por gesso é amplamente descrita na literatura e apresenta como vantagem a manutenção de um comprimento muscular constante. Desse modo, permite uma melhor comparação entre os músculos estudados (Heslinga et al., 1995). Esse modelo de imobilização diminui a ação de músculos considerados estabilizadores posturais. Neste sentido, espera-se que as fibras musculares do tipo I, que são estabilizadoras posturais, sejam mais susceptíveis à atrofia do que as fibras do tipo II de contração rápida. (Lieber et al., 1988).

Em 2002, Coutinho et al. propuseram um dispositivo alternativo ao modelo de gesso para imobilização de ratos que restringe os movimentos de quadril, joelho e tornozelo com objetivo de estudar os efeitos do desuso muscular. Para tanto, utilizaram malha de aço e algodão com algumas vantagens se comparado com o modelo de gesso como o baixo custo, baixo peso e a possibilidade de ser ajustado para o mesmo animal ou em outros com tamanho similar.

O modelo proposto pelo grupo de metabolismo muscular da Universidade Metodista de Piracicaba é a órtese de resina acrílica, um sistema que promove a

imobilização da articulação do tornozelo tanto em posição de encurtamento como em posição de 90°. Esse modelo apresenta algumas vantagens se comparado com o modelo de gesso como o baixo peso, possibilidade de ser ajustado para o mesmo animal, impossibilita o animal de retirar a órtese e permiti a deambulação (Silva et al., 2006). Alguns trabalhos deste grupo de pesquisa demonstraram que este modelo provocou redução da massa muscular, da área das fibras do músculo sóleo, das reservas de glicogênio, da força máxima necessária para a ruptura muscular e aumento da densidade de área do tecido conjuntivo do músculo sóleo. (Delfino et al., 2005; Durigan et al., 2005; Schwarzenbeck et al., 2005).

Diante do exposto, é necessário salientar que os estudos de imobilização apresentam caráter multifatorial diferindo quanto ao modelo e material utilizado para promover o desuso, tempo da imobilização, posição articular, atividade eletromiográfica e tipagem das fibras musculares analisadas, e isso, conseqüentemente, determina os resultados (Dias et al., 2005, Durigan et al., 2005).

1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AÇÕES DA INSULINA

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica. A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (Saad, 1994, White, 1997).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, já foram descrito inúmeros substratos do receptor de insulina, porém, merece destacar que quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2

(camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (Saad et al., 1992, Carvalheira et al., 2002a).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que reduz a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina. A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina. A PI-3 quinase foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y= tirosina, M= metionina e X= qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3-quinase ativa o domínio catalítico associado. A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC, porém a função destas proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (Carvalheira et al., 2002a).

Além da ativação da PI 3-quinase, outros sinais também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose. Essa segunda via envolve a fosforilação do protooncogene Cbl a associado com a proteína adaptadora CAP formando o complexo Cbl-CAP que ao migrar para a membrana celular interage com a proteína CrkII que fica associada com a proteína C3G que é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10 ativando-a. Uma vez ativada, TC10 causa um sinal para a translocação da proteína GLUT4, em paralelo à ativação da via da PI 3-quinase (Thomas e Hall, 1997).

A insulina também estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) quinase, que é uma via iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da

casca da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR. mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase (p70^{rsk}), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1, que aumenta a síntese protéica via aumento da translação de proteínas (Cross et al., 1995).

1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Atletas de alta performance procuram maximizar seus resultados a todo custo e, para isso, muitas vezes associam ao treinamento físico a utilização de substâncias ilegais, como os Esteróides Anabólicos Androgênicos (EAA). Estas substâncias são compostos naturais ou sintéticos formados a partir da testosterona e seus derivados, sendo divididos em dois grupos, a saber: os derivados esterificados e os derivados alcalinizados. Os primeiros são representados pelo propionato de testosterona, enantato de testosterona e cipionato de testosterona sendo utilizados preferencialmente pela via intramuscular, permanecendo ativos por dias e semanas, por outro lado, o segundo grupo é utilizado por via oral (Snyder, 2001).

Recentes estudos direcionados a avaliação do comportamento farmacológico destes agentes indicam uma prescrição voltada a processos catabólicos manifestados em patologias e situações específicas como infecções crônicas, cirurgias extensivas, trauma severo, deficiência hormonal de testosterona, desnutrição, anemia aplástica, impotência sexual (por insuficiência testicular), puberdade masculina retardada, eunequismo (castração), portadores de HIV, osteoporose e hipogonadismo, climatério, em pessoas portadoras de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA - diminuição da degradação do músculo e manutenção da massa muscular), tratamento de angioedema hereditário ou infecção contínua, na combinação com o exercício de *endurance* sobre a performance cardíaca e no aumento da tolerância ao exercício, além de, em animais, ativar a regeneração de tecidos, como o sangüíneo e córneo, sendo importante salientar que o efeito foi mais expressivo em fibras de contração lenta do que em fibras de

contração rápida (Liang et al., 1993; Tamaki et al., 2001; Hartgens e Kuipers, 2001; Larsson et al, 2002; Sattler et al., 2002; Tylicki et al., 2007).

Na década de 70, houve um crescente interesse e desenvolvimento de estudos cujo eixo norteador estivesse contido na manutenção e restabelecimento da força muscular em indivíduos jovens ou idosos (Simonson et al, 1974). Sequencialmente, um estudo de Ryan (1981) demonstrou que durante a Segunda Guerra Mundial, os EAA foram amplamente utilizados para restaurar o balanço positivo de nitrogênio em vítimas desnutridas e submetidas a jejum forçado.

Desenvolvido pelo laboratório Organon e introduzido no mercado em 1962, o decanoato de nandrolona ou Deca-Durabolin®, cuja substância ativa é a nandrolona, é um dos EAA mais utilizados no mundo (Cunha et al, 2006), encontra-se disponível comercialmente como uma preparação anabólica injetável com ação prolongada de até três semanas, após administração intramuscular em humanos (Kutscher et al, 2002). Comparativamente à testosterona, a nandrolona apresenta maior ação anabólica e menor atividade androgênica (Wilson 1988, Silva 2002).

Todos os esteróides ditos anabólicos são compostos derivados da testosterona, os quais, atuando sobre os receptores androgênicos, modulam de forma indissociável tanto os efeitos androgênicos como os anabólicos. Tais substâncias variam com relação à atividade anabólica androgênica existindo uma hierarquia quanto a sua relação. Assim a metandrostenolona é 2-5vezes mais potente que a testosterona e a oximetolona, oxandrolona, nandrolona e estanozolol apresentam relações 9,10,10,30 vezes maior, respectivamente. Por sua vez, nenhum fármaco atualmente disponível é capaz de desencadear somente efeitos anabólicos (Lise et al, 1999).

Os EAA vêm despertando a atenção de pesquisadores na área da saúde devido sua utilização sem prescrição médica e em altas doses por atletas, com o objetivo de aumentar a massa muscular, para fins estéticos ou melhorar o desempenho físico (Creutzberg et al, 1999). Esta utilização apresenta vários efeitos colaterais, tais como, atrofia do tecido testicular, tumores hepáticos e prostáticos (Yesalis, 1993), alterações no metabolismo lipídico (Kuipers et al, 1991), alterações emocionais (Gruber e Pope, 2000), surgimento de sintomas psicóticos (Pope Jr et al, 1988) e retenção hídrica (Joumaa e Léoty, 2001).

Além disso, existem trabalhos relacionando o abuso dos EAA com alterações cardiovasculares como, predisposição a hipercoagulabilidade, aumento da

agregação plaquetária e diminuição da fibrinólise (Falkenberg et al, 1997), alargamento da parede ventricular esquerda, aumento da espessura do septo interventricular e do índice da massa do ventrículo esquerdo, porém com preservação das funções sistólicas e diastólicas normais (Di Belo et al., 1999), trombose ventricular e embolismo sistêmico (McCarthy et al, 2000), cardiomiopatia dilatada, infarto agudo do miocárdio por oclusão da artéria descendente anterior e morte súbita por hipertrofia ventricular esquerda (Ferrera et al, 1997).

Os EAA, após administrados e presentes na corrente sangüínea, apresentam-se ligados à proteínas transportadoras específicas, tais como a albumina e a globulina fixadora de hormônios sexuais (SHBG) (Rogozkin, 1979) . Dentre os estudos que descrevem o mecanismo de ação do esteróide na célula alvo, Deschenes et al. (1994) e Hiipakka et al. (1998) demonstraram que ao aumentar a oferta destes hormônios para a célula, o mesmo pode seguir dois caminhos: Primeiro, ligando-se a receptores citoplasmáticos, formando um complexo hormônio-receptor, o qual, no núcleo combina-se com parte do DNA e exerce função de estimular a síntese de proteínas via RNA mensageiro; ou segundo, ligando-se a receptores intranucleares, formando um complexo hormônio-receptor que ativa a síntese de proteínas da mesma forma descrita anteriormente. Porém, neste caso, o composto ativo já está dentro do núcleo para interagir com o DNA.

Há tempo, o metabolismo energético, em especial no que se refere ao conteúdo muscular de glicogênio, tem sido o eixo norteador da investigação de inúmeros cientistas, sendo consenso que o tempo de sustentação de determinado exercício está relacionado com a quantidade de glicogênio muscular disponível, desta forma altos conteúdos referem-se à melhora na performance e baixas reservas tem relação direta com a exaustão (Baldwin et al, 2003; Shahidi 2001). Com o prolongamento do exercício, as reservas musculares de glicogênio diminuem progressivamente e parte da energia despendida no esforço passa a ser fornecida pelos triglicerídeos, por glicose e por ácidos graxos livres (AGL) circulantes no plasma (Romijn et al, 1993; Lima-Silva et al, 2007). Vieira (2003) verificou que o esteróide em questão apresenta resultados de hepatotoxicidade dose-dependente, quando utilizado nas diferentes concentrações: dose clínica 0,714mg/kg/semana e dose usualmente utilizada em academias 5 mg/kg/semana (Vieira, 2003, Cunha et al., 2006).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Embora existam diversas aplicações clínicas e não clínicas inerentes aos EAA, não há relatos na literatura sobre a aplicabilidade deste esteróide associado ao processo catabólico gerado por períodos de imobilização.

A nandrolona por ter um efeito estimulador da síntese proteica possivelmente auxiliará a musculatura submetida à imobilização na manutenção de suas reservas energéticas e massa muscular.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral norteador deste trabalho foi investigar alterações em músculos esqueléticos de ratos submetidos à imobilização tratados com decanoato de nandrolona, com foco de análise nas reservas de glicogênio e suas relações quimio-metabólicas. Um estudo de doses acompanhará as avaliações.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Baseado na proposta geral, os objetivos específicos são:

- Avaliar os efeitos da nandrolona na doses: 0,7mg/kg/semana (concentração utilizada na prática clínica) sobre as reserva de glicogênio e na relação proteínas totais/DNA de músculos normais e imobilizados.
- Avaliar os efeitos da nandrolona na dose de 5mg/kg/semana que equivale à dose indicada na literatura e considerada como abusiva, a qual é geralmente administrada a atletas no início da prática esportiva, sobre as reserva de glicogênio e na relação proteínas totais/DNA de músculos normais e imobilizados.
- Avaliar o comportamento eletrocardiográfico de ratos tratados com nandrolona.
- Avaliar a sensibilidade secretória de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle e tratados com a dose clínica de nandrolona.
- Avaliar de acordo com parâmetros biomolecular o comportamento da enzima

mTOR e AKT.

- Avaliar as condições plasmáticas no âmbito hematológico e Bioquímico de dos ratos tratados com nandrolona.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade com peso de 200 a 300 gramas, os quais receberam água e alimentação *ad libitum* sendo mantidos em ambiente com temperatura constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas, sendo mantidos em gaiolas coletivas contendo no máximo 4 animais e distribuídos segundo a tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos ratos em grupos experimentais (n=6).

1	Controle
2	Tratado com decanoato de nandrolona – 7 dias na dose clínica (0,714mg/kg/semana, dividida em 3 doses)
3	Tratado com decanoato de nandrolona – 7 dias na dose intermediária (5mg/kg/semana, dividida em 3 doses)
4	Imobilizado 7 dias
5	Imobilizado tratado com nandrolona – 7 dias na dose clínica (0,714mg/kg/semana, dividida em 3 doses)

4.2. IMOBILIZAÇÃO

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg/ peso, ip) e a pata posterior esquerda imobilizada com órtese de resina acrílica mantendo a posição do tornozelo a 90° , deixando as articulações do joelho e quadril livres. O modelo foi adaptado no membro posterior, associado a uma cinta de PVC (diâmetro

40mm) por dois rotadores laterais (15mm de extensão), os quais permitiram a sua livre movimentação (Silva et al., 2006).

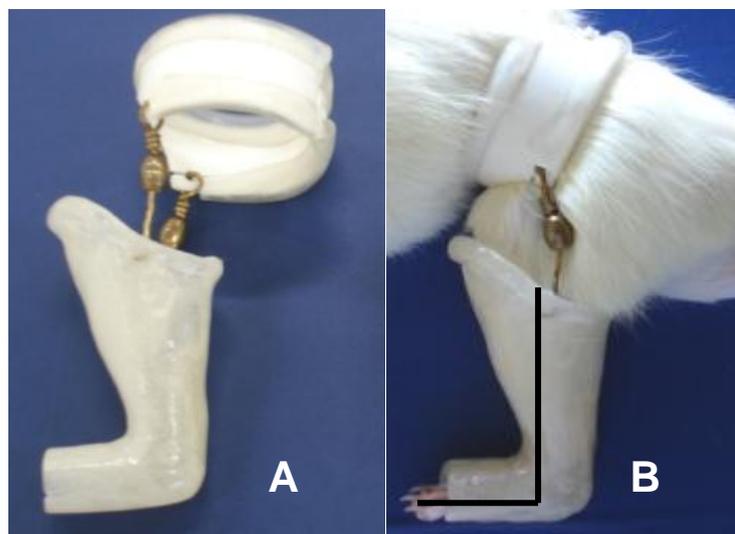


Figura 1 – Adaptação da órtese no membro posterior do animal. (A) modelo de órtese que não interfere na deambulação, porém, permite a descarga de peso no membro imobilizado. (B) modelo de órtese adaptada ao animal mantendo o tornozelo na posição de 90°.

4.3. CONTEÚDO MUSCULAR DE GLICOGÊNIO

Para a determinação do glicogênio muscular, as amostras foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos e o glicogênio precipitado submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu et al., (1970). Os valores estão expressos em mg/100 mg de peso úmido. Os músculos avaliados foram o sóleo, gastrocnêmio porção branca e gastrocnêmio porção vermelha.

4.4. TRATAMENTO COM DECANOATO DE NANDROLONA

O Decanoato de Nandrolona (Deca Durabolin®) foi administrado na concentração de 0,714mg/kg/semana ou 5mg/kg/semana, dividida em 3 doses pela via sub cutânea. (Vieira, 2003; Zao et al., 2008).

4.5. ANÁLISE ELETROCARDIOGRÁFICA

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg/ip), mantidos em posição supina, com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade 2 N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isométrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT/\sqrt{RR}$) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ($QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$). As análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (COSTA , 2008). (Figura 2)



Figura 2. Captação dos sinais eletrocardiográfico através do ECG – Heart Ware 98 (HW).

4.6. AVALIAÇÕES DA RESPOSTA SECRETÓRIA DA INSULINA

Para avaliação da resposta secretória da insulina à glicose, as ilhotas foram isoladas segundo a técnica originalmente descrita por Boschero, Delatre e Santos (1984). Em cada experimento, foram sacrificados de um a três animais por concussão cerebral e decapitados para sangria, neste caso foram utilizados os animais controle e suplementado com a dose de 0,7mg/kg/semana. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no

extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 ml de solução de Hanks contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando um fluxo retrógrado, a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12 x 2 cm) e incubado por aproximadamente de 18 min a 37 °C.

Em seguida, ainda em 37 °C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 ml) depois de 3 minutos de decantação. Após repetir essa operação por 3 vezes, o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada. As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos dois grupos experimentais, foram coletadas alternadamente em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 ml de solução tampão Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina, a qual foi adicionado glicose 5,6 mM e incubada por 45 minutos (pré-incubação), a 37 °C em atmosfera de carbogênio, pH 7,4, a solução de Krebs foi substituída por 1,0 ml do mesmo tampão, contendo diferentes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L. Procedeu-se uma nova incubação durante 90 min, nas condições acima referidas. Ao término deste período, as placas foram devidamente colocadas no freezer (-20 °C) por 10 min e, o sobrenadante de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservado a -20° C, até o momento da dosagem da insulina secretada. A insulina secretada durante o período de incubação foi avaliada de acordo com o método descrito por Scott et al. (1981).

4.7. AVALIAÇÃO MOLECULAR (Western Blot)

Após sete dias os animais tratados com nandrolona 0,7 mg/kg/semana, foram anestesiados em câmara de CO₂, e em seguida decapitados, o músculo sóleo foi rapidamente retirado, lavado em solução salina e alocado em tampão de extração. O material extraído foi submetido à homogeneização em tampão de extração (100 mM Trisma base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina), à 4 °C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotocolorimétrico de Biureto, enquanto que a outra parte foi submetida à *immunoblotting*. Os reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e *immunoblotting* foram obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). As membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham

Corp. (Aylesbury, UK). O kit de quimioluminescência foi adquirido da empresa Pierce Endogen (Rockford, IL). Os demais materiais utilizados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (75 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos a 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD. A ligação dos anticorpos à proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (5 % BSA dissolvido em solução basal). A membrana de nitrocelulose foi incubada, *overnight*, com anticorpo específico anti-pmTOR e anti-pSer473AKT (#4058), foram obtidos da empresa Cell Signaling Technology (Beverly, MA), diluídos em solução para anticorpo (3 % BSA dissolvido em solução basal), e então, lavada por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02 % Tween 20). A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Após a revelação das autoradiografias, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica enquanto parceria realizada com o laboratório de Receptores de Insulina da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada após a conclusão de toda a fase experimental. Inicialmente foi realizado uma análise exploratória dos dados pelo programa Statgraphics Plus para Windows, onde foi aplicado o teste de normalidade de

Kolmogorov-Smirnov seguido da aplicação do teste de Tukey, $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi estruturada para contemplar diferentes pontos, setores e locais onde se expressa a ação da nandrolona.

Inicialmente optou-se por avaliar o perfil hematológico e bioquímico dos animais buscando informações relacionadas à toxicidade do tratamento e como pode ser observado na tabela 2, no que se refere ao hematócrito, os ratos tratados com nandrolona 5 mg/kg/ apresentaram valores 16,1% maiores se comparados ao grupo controle. Já a eritrometria mostrou valores 22% menores no grupo tratado com nandrolona 5mg/kg/ e 46% menor no grupo tratado com nandrolona 0,7mg/kg/semana, em comparação com o grupo controle. Este comportamento também foi observado com relação à concentração de hemoglobina sendo 17% menor no grupo tratado com nandrolona 5mg/kg e 27% menor no grupo tratado com nandrolona 0,7mg/kg.

Ao analisar-se a concentração plasmática de ácido láctico verificou-se valores 56,5% maiores no grupo tratado com nandrolona 5mg/kg, fato não observado no grupo tratado com a dose 0,7mg/kg que não diferiu do controle.

Quanto às demais análises não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros: leucometria, ácidos graxos livres, glicemia, conteúdo de gordura epididimal, concentração plasmática de albumina e peso da glândula adrenal. Dentro deste contexto, o peso de diferentes órgãos também não diferiu nas diferentes condições como pode ser observado na tabela 3.

Um ponto importante a se considerar está relacionado com a manutenção da homeostasia dos eritrócitos, visto a importância destas células no equilíbrio de distribuição de oxigênio. Assim, para contemplar esta abordagem foi realizada uma curva de fragilidade osmótica e pode-se observar na figura 3 que a sensibilidade celular frente à variação osmótica dos eritrócitos coletados de ratos controle é similar aquela observada nas células coletadas do grupo suplementado com nandrolona 0,7mg/kg.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e plasmáticos dos grupos controle (C); tratados com nandrolona nas doses de 0,7 mg/kg/semana (N 0,7) e tratados com nandrolona na dose de 5 mg/kg/semana (N 5). Valores expressos em média ± epm, n=6.

Parâmetro	C	N 0,7	N 5
Hematócrito (%)	43,9 ± 1,6	48 ± 1,4	51 ± 2,4*
Eritrometria (mm ³)	8,9 ± 0,4x10 ⁶	4,8 ± 1,4 x10 ^{6*}	6,9 ± 0,3 x10 ^{6*#}
Leucometria (1000/mm ³)	9,4 ± 2,4	8,7 ± 0,5	9,1 ± 1,4
Hemoglobina (g/dL)	15,7 ± 0,4	11,4 ± 0,21*	13 ± 0,9*#
Ácidos Graxos livres (mmol/L)	0,41 ± 0,1	0,43 ± 0,05	0,47 ± 0,07
Glicemia (mg/dL)	139,42 ± 11	135,76 ± 9,6	139,42 ± 9,1
Lactato (mmol/L)	1,65 ± 0,9	2,02 ± 0,6	3,8 ± 0,1*#
Albumina (g/dL)	1,69 ± 0,07	1,82 ± 0,08	1,93 ± 0,05

*significativo (p<0,05) em relação ao controle.

significativo (p<0,05) em relação ao grupo Nandrolona 0,7mg/kg/

Tabela 3. Peso (g) da gordura Peri- epididimal, glândula adrenal e coração dos grupos controle (C); tratados com nandrolona nas doses de 0,7 mg/kg/semana (N 0,7) e tratados com nandrolona na dose de 5 mg/kg/semana (N 5). Valores expressos em média ± epm, n=6.

Parâmetro	C	N 0,7	N 5
Gordura Peri- epididimal	6,32 ± 0,49	6,82 ± 0,68	7,11 ± 0,8*
Adrenal	0,08 ± 0,007	0,09 ± 0,004	0,09 ± 0,003
Coração	1,382 ± 0,4	1,362 ± 0,5	1,430 ± 0,4*

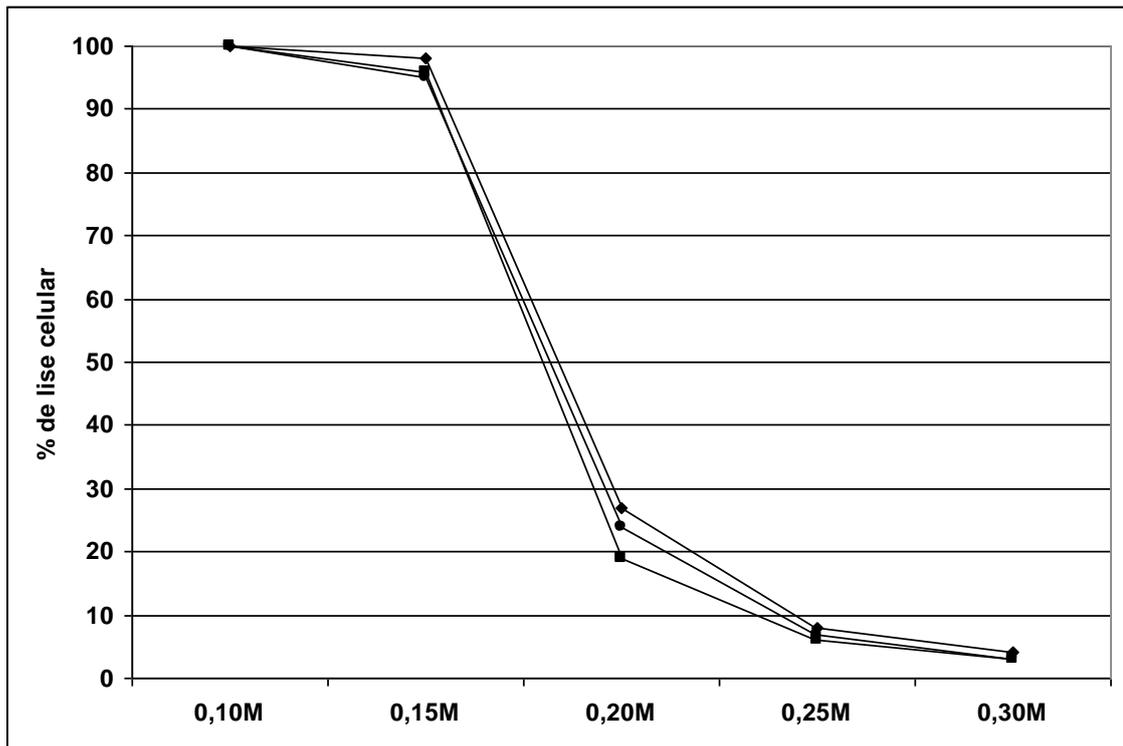


Figura 3. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos coletados de ratos controle (losango), tratados com nandrolona 0,7mg/kg/semana (quadrado) e tratados com nandrolona 5mg/kg/semana (triângulo). Os valores representam a média \pm epm, n=6.

Foram estudados os parâmetros eletrocardiográficos indicadores do status funcional do coração sendo escolhido para a análise a duração do intervalo QRS, o intervalo QTc e a frequência cardíaca de repouso. A avaliação foi realizada tanto em ratos controle quanto em ratos tratados com o esteróide nandrolona nas doses de 0,7mg/kg/semana ou 5mg/kg/semana. Os dados mostram que na dose de 0,7mg/kg/semana houve homogeneidade no comportamento dos intervalos QRS e QTc. Por outro lado, nos ratos tratados com a dose 5mg/kg/semana foi observado que o intervalo QTc apresentou valores 19,6% e 12,1% maiores se comparado aos grupos controle e tratado com a dose de 0,7mg/kg/semana, respectivamente. Ainda foi observado que nesta dose, a frequência cardíaca de repouso também apresentou-se elevada atingindo valores 9,2% e 6,6% maior se comparado com o grupo controle e tratado com nandrolona na dose 0,7mg/kg/semana (tabela 4).

Tabela 4. Intervalos QRS (ms), QTc (m/s) e Frequência cardíaca (FC, bat/min) do eletrocardiograma dos grupos controle (C); tratados com nandrolona nas doses de 0,7 mg/kg/semana e 5 mg/kg/semana. Valores expressos como média \pm epm, n=6.

Grupos	QRS (ms)	QTc (ms)	FC (bat/min)
Controle	92,57 \pm 5	341,09 \pm 15	186,46 \pm 0,8
Tratado 0,7mg/kg/	102 \pm 3	364 \pm 10	191 \pm 7
Tratado 5mg/kg/	94,46 \pm 7	408,1 \pm 1*	203,69 \pm 0,4*

*p>0,05 em relação ao controle.

A seguir optou-se por avaliar as condições energéticas do ventrículo após tratamento com nandrolona, sendo escolhido como parâmetro a determinação do conteúdo de glicogênio. Nesta etapa foi observado que somente na concentração mais elevada, ou seja, 5 mg/kg/ houve comprometimento na homeostasia das reservas glicogênicas como mostra a figura 4.

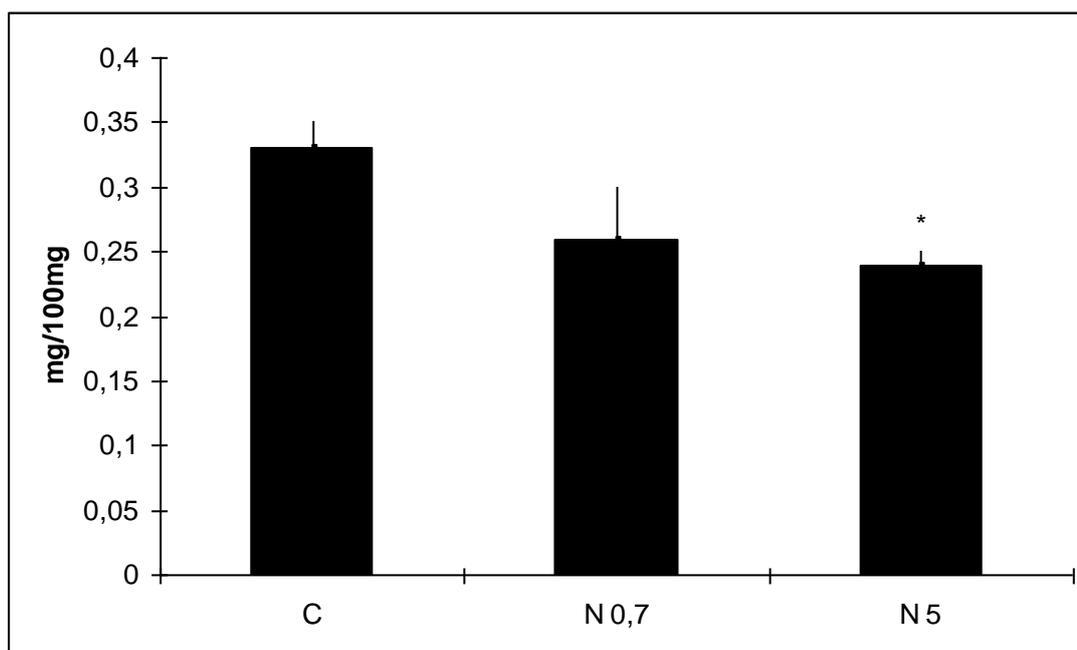


Figura 4. Conteúdo glicogênio ventricular (mg/100mg) de ratos controle (C), e tratados com nandrolona 0,7 mg/kg/semana (N 0,7) ou 5 mg/kg/semana (N5). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6.

Após descrever os eventos sistêmicos relacionados à suplementação com nandrolona 0,7mg/kg/semana passou-se a avaliação das reservas de glicogênio iniciando pela reserva hepática, pois representa o principal reservatório do organismo. Nesta análise foi verificado

que o grupo tratado com a dose 0,7mg/kg/ apresentou reservas 37% maiores que o grupo controle enquanto o grupo que foi tratado com nandrolona 5 mg/kg/ apresentou redução de 20% se comparado ao controle, como mostra a figura 5.

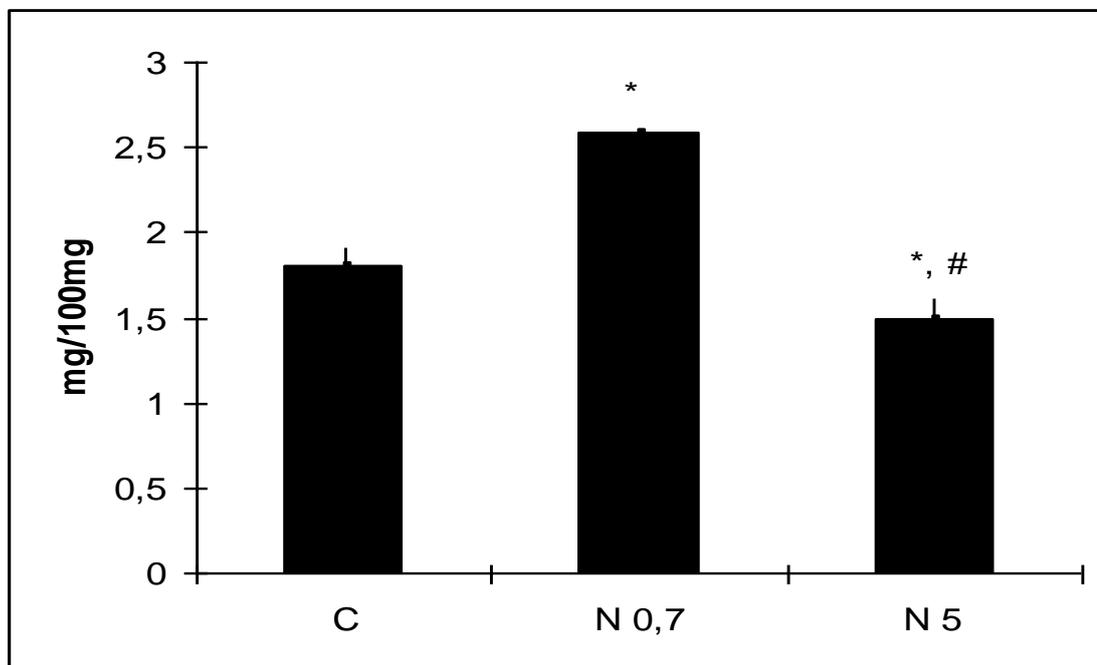


Figura 5. Concentração hepática de glicogênio (mg/100mg) de ratos controle (C); tratados com nandrolona 0,7/mg/kg/semana (N 0,7) e tratados com nandrolona 5 mg/kg/ (N 5). Os valores representam a média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ se comparado ao N 0,7.

Uma vez observado alterações em parâmetros metabólicos dos hepatócitos, optou-se por avaliar uma possível toxicidade ligado ao tratamento com nandrolona sendo observado que em altas doses (5 mg/kg/) a nandrolona promoveu elevação de 14% na concentração plasmática de AST; 20% no concentração de ALT e 33% na concentração da gama-GT (vide tabela 5).

Tabela 5: Padrão Bioquímico de ratos controle (C) e tratados com nandrolona 0,7/mg/kg/semana (N 0,7) e nandrolona 5 mg/kg/ (N 5). Os valores correspondem às médias \pm epm, n=6.

	Aspartato aminotransferase AST (U/L)	Alanina aminotransferase ALT (U/L)	Gama-glutamilttransferase (U/L)
C	110 \pm 1,3	60,4 \pm 3,4	0,39 \pm 0,02
N 0,7	113 \pm 3,0	62 \pm 2,2	0,44 \pm 0,05
N 5	125,42 \pm 1,6*	73 \pm 1,6*	0,52 \pm 0,03*

*p<0,05 comparado ao controle.

A seguir passou-se a avaliar o conteúdo muscular de glicogênio e como pode ser observado na figura 6, as reservas o músculo sóleo (fibra tipo I) não diferiu entre os diferentes grupos submetidos ao tratamento, por outro lado, os músculos gastrocnêmio porção branca (fibras tipo II) e gastrocnêmio vermelho apresentaram redução significativa nas reservas na presença de nandrolona na dose de 5 mg/kg/ atingindo 10% e 15%, respectivamente, se comparado ao grupo controle.

Ao verificarmos comprometimento das reservas energéticas frente à dose 5mg/kg/, optou-se por seguir o estudo utilizando a dose de 0,7mg/kg/ que é clinicamente utilizada e sugestiva de menor toxicidade. De acordo com a proposta experimental foi avaliado o comportamento das reservas glicogênicas de músculos que passaram por um período de imobilização de 7 dias sendo observado que a imobilização promoveu uma significativa redução nas reservas glicogênicas atingindo 60% no sóleo, 55% no gastrocnêmio porção branca e 51% no gastrocnêmio porção vermelha (vide figura 7).

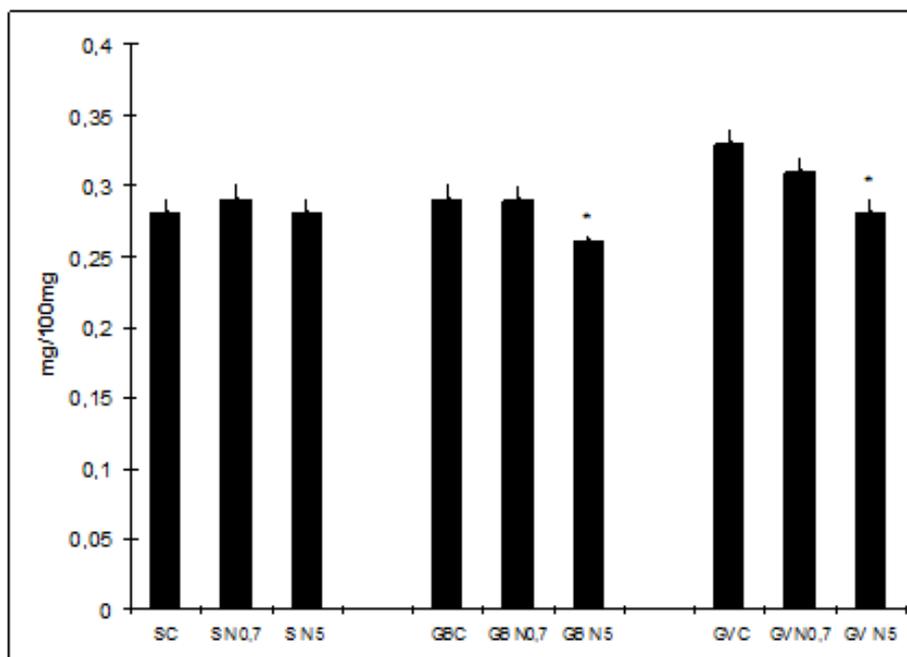


Figura 6. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) de ratos controle (C); tratados com nandrolona 0,7/mg/kg/semana (N 0,7) e tratados com nandrolona 5 mg/kg/ (N 5). Os valores representam a média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

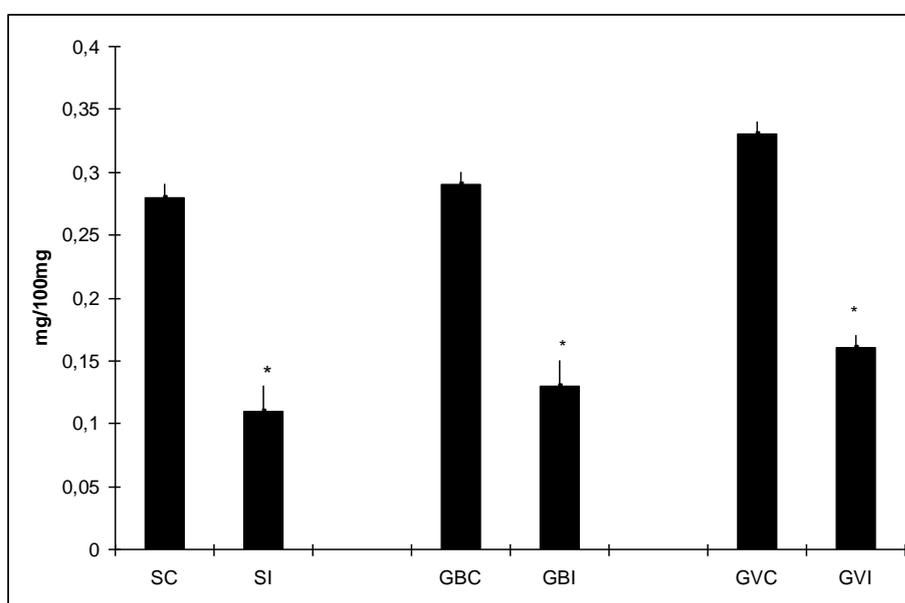


Figura 7. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) de ratos controle (C) e imobilizados durante 7 dias (I). Os valores representam a média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Havendo constatado comprometimento das reservas energéticas em detrimento da imobilização passou-se a avaliar o comportamento destas reservas glicogênicas na presença da nandrolona 0,7mg/kg/ sendo verificado elevação no conteúdo do músculo sóleo e no gastrocnêmio vermelho onde as reservas atingiram valores 27% e 37% maiores, respectivamente como mostra a figura 8.

No intuito de aumentar a dinâmica de análise passou-se a avaliar a relação proteína total/DNA onde pode-se observar na tabela 6 que a imobilização promoveu redução atingindo 25,7% no sóleo, 23,5% no gastrocnêmio porção branca e 29% no gastrocnêmio vermelho. Por outro lado, frente ao tratamento com nandrolona na concentração de 0,7 mg/kg/semana foi observado elevação de 18,5% no sóleo, 20% no gastrocnêmio porção branca e 14 % no gastrocnêmio vermelho frete ao grupo imobilizado. Cabe ressaltar que a avaliação da ação do tratamento com nandrolona no músculo imobilizado mostrou valores expressivamente maiores atingindo 23% no sóleo, 20% no gastrocnêmio porção branca e 29% no gastrocnêmio vermelho, se comparado ao imobilizado não tratado.

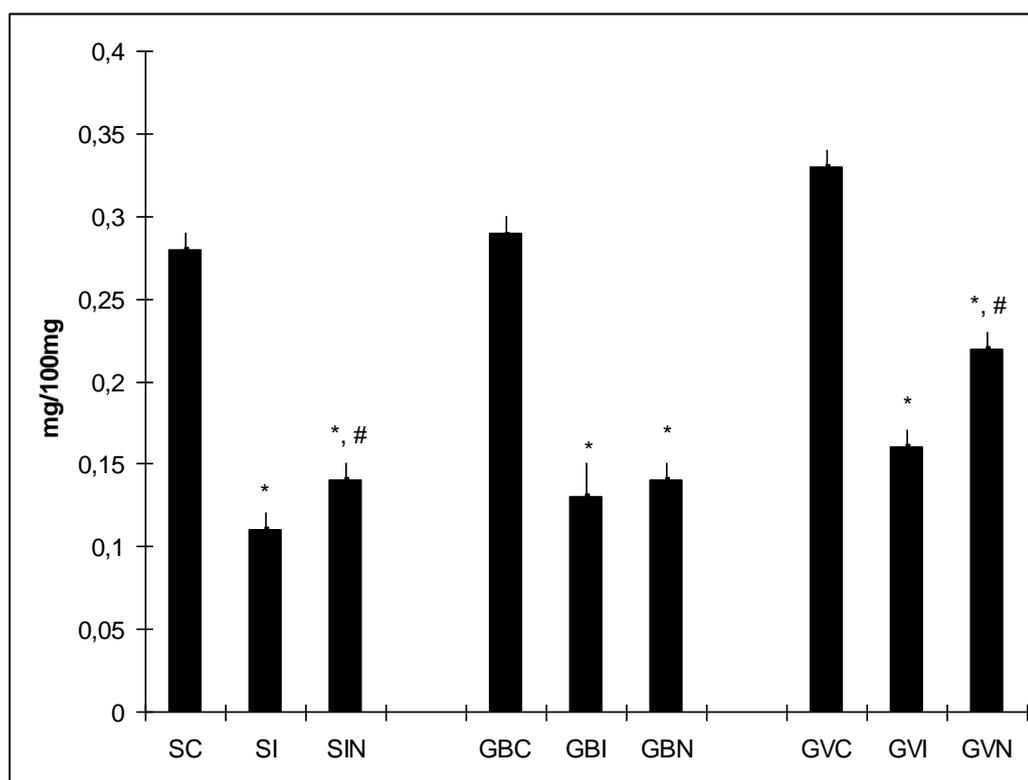


Figura 8. Concentração de glicogênio (mg/100mg) do músculo sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) de ratos controle (C), imobilizados (I) e imobilizados durante 7 dias tratados com nandrolona 0,7/mg/kg/semana (N). Os valores representam a média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado.

Tabela 6. Razão Proteínas totais/DNA (mg/100mg) dos músculos sóleo,

gastrocnêmio branco (GB) e gastrocnêmio vermelho (GV) dos animais controle (C), imobilizado (I) tratados com nandrolona (N) e imobilizado tratado com nandrolona 0,7/mg/kg/semana (IN). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado.

	C	I	N	IN
S	116,21 \pm 10	86,29 \pm 3,1*	137,82 \pm 6*	106,38 \pm 7*,#
GB	125,84 \pm 11	96,25 \pm 6,1*	151,12 \pm 9*	115,35 \pm 8*,#
GV	109,13 \pm 9	77,43 \pm 4,5*	124,87 \pm 3,7*	99,87 \pm 6*,#

Na busca de identificar o possível padrão hormonal envolvido na inter-relação nandrolona/manutenção das reservas energéticas optou-se por avaliar a capacidade secretória de insulina. Para tal, ilhotas de ratos tratados com nandrolona foram isoladas, incubadas e a insulina secretada avaliada. Neste contexto observou-se que na presença de concentrações crescentes de glicose, a secreção de insulina foi potencializada atingindo valores 100% maiores em 5.6 mM; 33% maiores em 8.3 mM e 41% maiores na presença de 16.7 mM, como mostra a figura 9.

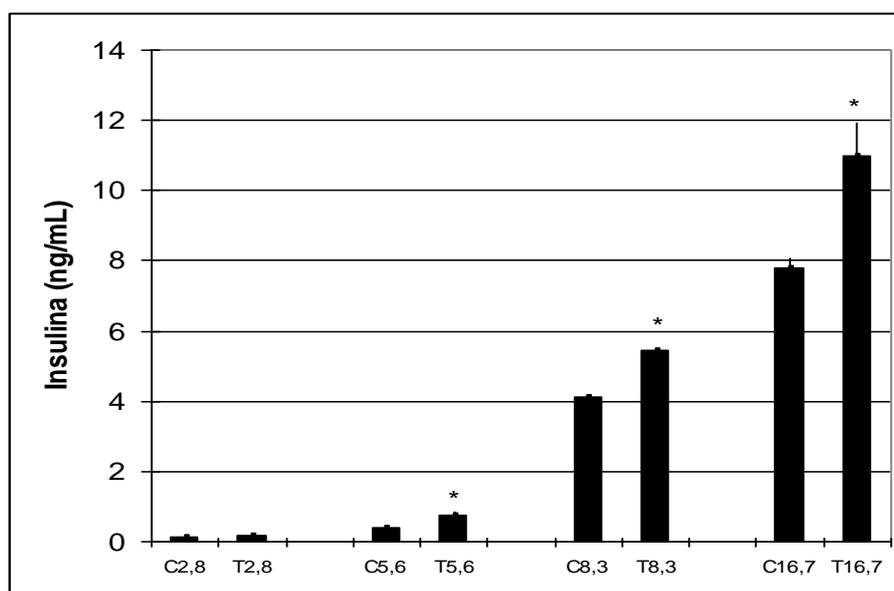


Figura 9. Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos controle (C) e de ratos tratados com Nandrolona (0,7/Kg/semana) durante 7 dias e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/80min, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Como etapa final e dentro de uma análise molecular, foi avaliada no músculo

gastrocnêmio a fosforilação da enzima mTOR que é uma enzima chave do processo anticatabólico, e como pode se observar na figura 10, a nandrolona elevou em 10% a atividade enzimática de músculos controle, no entanto, elevou em 51% a atividade do músculo imobilizado, sugerindo uma potente ação anticatabólica.

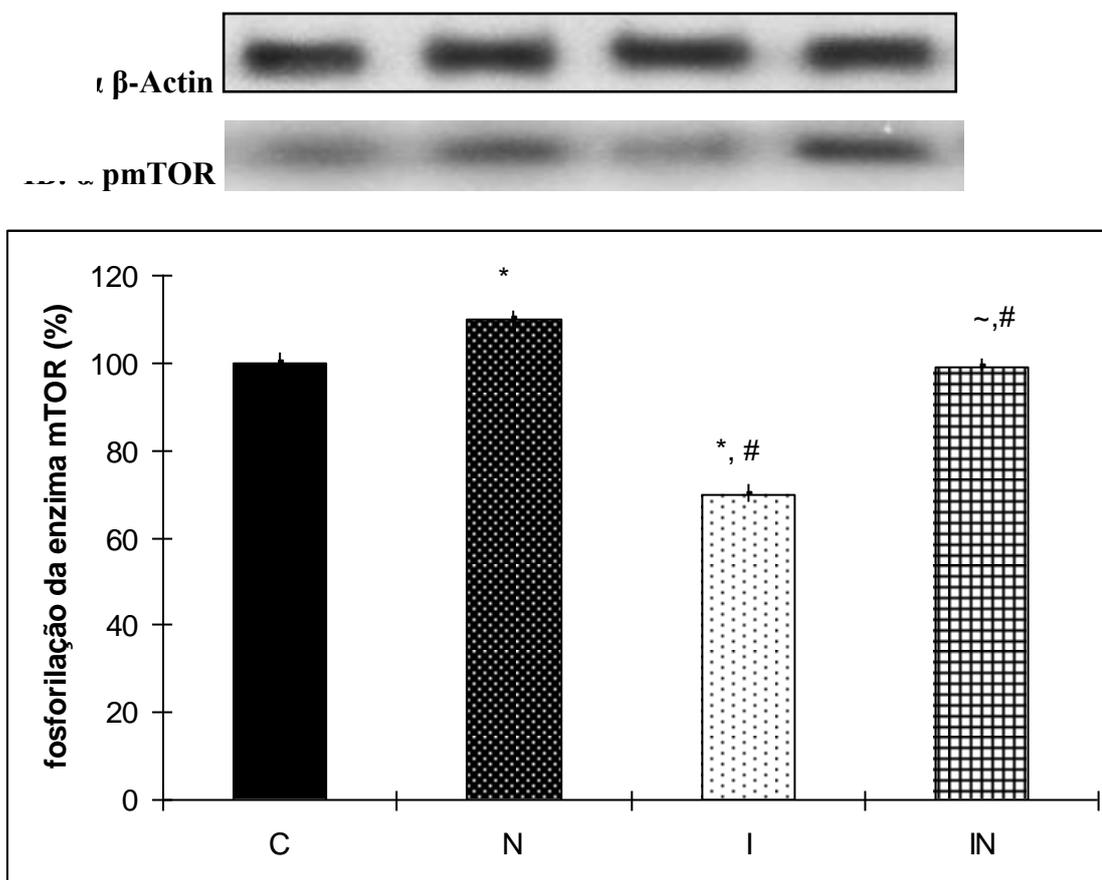


Figura 10. Porcentagem de fosforilação da enzima mTOR no grupo no grupo controle (C), tratado com nandrolona (N 0,7/Kg/semana), Imobilizado (I) e Imobilizado tratado com nandrolona (IN, 0,7/Kg/semana). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao N; ~ $p < 0,05$ comparado ao I.

Para verificar a expressão da nandrolona na via insulínica foi avaliada a atividade da enzima AKT e como pode ser vista na figura 11, houve elevação de 80% na atividade de músculos normais e 28% nos músculos imobilizados, indicando ativação da via insulínica.

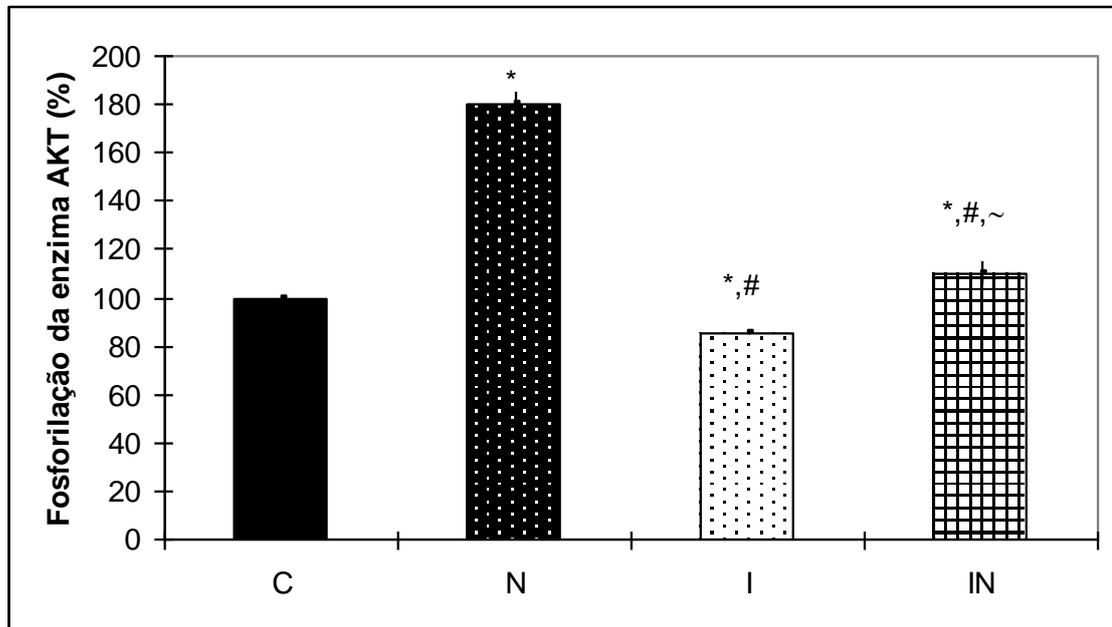


Figura 11. Porcentagem de fosforilação da enzima AKT no grupo controle (C), tratado com nandrolona (N 0,7/Kg/semana), Imobilizado (I) e Imobilizado tratado com nandrolona (IN, 0,7/Kg/semana). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao N; ~ $p < 0,05$ comparado ao I.

6. DISCUSSÃO

A apresentação da discussão será realizada seqüencialmente acrescentando informações e integrando as diferentes nuances ligadas as ações da nandrolona.

A literatura científica se refere aos ergogênicos (do grego “*ergon*”, trabalho, e “*gennan*”, produzir) como sendo substâncias que melhoram o desempenho de um atleta, no entanto, os objetivos farmacológicos envolvidos no desenvolvimento e formulação dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) visavam à aplicação clínica da molécula no tratamento de inúmeras patologias (Wilmore e Costill, 1999). Apesar do enfoque de sua aplicabilidade nas ciências médicas, tem sido descrito que estas substâncias facilitam o crescimento da musculatura esquelética, ampliando sua prescrição, uma vez que, podem ser utilizadas em estados patológicos onde há perda de massa muscular, existindo aí uma vertente anticatabólica.

Apesar de todo este contexto de utilização no âmbito de preservação de

função, sabe-se que há abuso na utilização destes compostos quer seja por atletas de alto nível ou por praticantes de atividade física em academias. Farmacologicamente, o decanoato de nandrolona é um derivado da testosterona e está entre os EAA mais consumidos de acordo com o *National Institute on Drug Abuse* devido ao seu moderado potencial androgênico associado às boas propriedades anabólicas (Nida, 2007).

A terapia androgênica com nandrolona pode ser utilizada no tratamento da osteoporose, da anemia causada por redução na eficiência funcional medula óssea ou depressão medicamentosa, como coadjuvante no tratamento de câncer de mama avançado, em garotos com estatura reduzida e até mesmo em situações especiais da obesidade, ainda há relatos de uso de esteróides anabólicos em baixas doses por via transdérmica no tratamento de doenças cardiovasculares, tendo efeitos antiaterogênicos e como agentes antianginosos (Graceli et al., 2010).

No início do desenvolvimento deste estudo optou-se por avaliar o perfil hematológico e bioquímico gerados após o tratamento com as duas doses de nandrolona, ou seja, uma dose clínica e outra usada de forma abusiva. Sabe-se que a hematopoiese ocorre na medula óssea durante toda a vida do indivíduo e o ciclo vital das células sanguíneas se regula por complexos mecanismos homeostáticos. Apesar de cada espécie animal possuir mecanismos próprios de controle dos valores de parâmetros fisiológicos, é sabido que podem exibir variações decorrentes de diversos fatores quer sejam orgânicos ou ambientais, existindo na literatura inúmeras tabelas de valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos de laboratório (Pinheiro, 1998; Naranjo et al., 2001; Dantas et al., 2006)

A literatura mostra a variabilidade nos valores hematológicos em ratos existindo uma ampla faixa descrita, na qual o hematócrito varia entre 43 - 47%; com relação à concentração de hemoglobina os valores variam de 13,3 - 16,1g/dL e no que se refere à eritrometria os valores de normalidade variam de $6,6 - 8,9 \times 10^6$ (Dantas et al., 2006; Baldochi et al., 2006; Andersen et al., 2007). Neste contexto, o grupo controle apresentado neste estudo mostra parâmetros hematológicos similares com aqueles relatados na literatura.

No que se refere aos grupos tratados com nandrolona, tem sido descrito que dentre as diferentes ações dos EAA destaca-se a capacidade de promover a regeneração de diversos tecidos, inclusive o sanguíneo (Larsson et al., 2002). Ao se comparar os grupos experimentais pode-se verificar que os grupos tratados com

nandrolona apresentaram valores diferentes em parâmetros sanguíneos da série vermelha, se comparado ao controle. Neste aspecto, deve-se considerar que na literatura há relatos indicando que as mudanças em parâmetros sanguíneos ocorrem em tratamentos à longo prazo, ou seja, acima de 4 à 8 semanas, diferindo do contexto deste trabalho. Por sua vez, considera-se ainda que, mesmo o grupo tratado com nandrolona sendo estatisticamente diferentes do grupo controle, os valores observados acompanha índices hematimétricos considerados normais, sugerindo que dentro do período estipulado no âmbito desta análise, trata-se de variação fisiológica da espécie (Peres et al., 2005).

As relações fisiológicas entre o tratamento com nandrolona e outros glóbulos sanguíneos tem sido descrito que a nandrolona não modifica o número e a função das células sanguíneas da série branca e nem das plaquetas (Spiers, 1981; Failace, 2003; Nelson, 2006). Neste sentido, este estudo corrobora com outros autores demonstrando que a nandrolona também não interfere no equilíbrio funcional celular, de forma que, as hemácias mantiveram a resistência osmótica inalterada na presença do esteróide. Este dado apresenta-se de grande importância tendo em vista que este esteróide, em especial, é utilizado juntamente com o hormônio eritropoietina no tratamento de anemia associada a insuficiência renal (Peres et al., 2005).

Outros aspectos avaliados foram parâmetros bioquímicos representados pela glicemia, lactatemia e a concentração plasmática de albumina, sendo verificado que os grupos tratados com nandrolona durante 7 dias não diferiram do controle acompanhando a literatura (Peres et al., 2005, Dantas et al., 2006).

Tem sido relatado na literatura que o uso de EAA é acompanhado de ativação do eixo hipotálamo-hipofisário e conseqüente modificação no perfil hormonal plasmático visto a grande integração sinalizadora que envolve o hipotálamo e suas conexões neurais (Naraghi et al., 2010). Certamente estas mudanças endócrinas alteram o equilíbrio funcional de diversos órgãos, sendo sugestivo a avaliação do peso de algumas estruturas alvo, assim, não foi observado modificação no peso da supra-renal, na gordura peri-epididimal bem como no coração, indicando que o tratamento com nandrolona na dose clínica durante 7 dias não alterou a massa destes órgãos.

Uma vez que não houve mudanças no peso do coração tornou-se sugestiva uma análise do perfil eletrocardiográfico, para identificar qualquer alteração funcional

e o ECG revelou mudanças no padrão elétrico no músculo cardíaco representado pela elevação no tempo de propagação do sinal na câmara ventricular, uma vez que, o QRS (registro que representa a despolarização do músculo ventricular) ficou mais longo indicando sobrecarga. Este fato foi acompanhado por um evento similar observado no intervalo QTc (que representam o tempo decorrido do início da despolarização ventricular até sua completa repolarização, corrigidos pela fórmula de Bazett), o qual também se apresentou elevado indicando retardo nos processos inerentes a repolarização das câmaras ventriculares. Recentemente foi sugerido que alterações elétricas do músculo cardíaco acompanham o tratamento com esteróide reiterando as observações descritas neste trabalho (Marocolo et al., 2010).

Um ponto a se considerar é a presença de uma família de receptores androgênicos demonstrada em uma multiplicidade de tecidos, inclusive no sistema cardiovascular (Gustafsson, 2003). Em especial, no que tange ao tecido muscular, os receptores foram caracterizados em ratos e humanos apresentando 85% de identidade na expressão do receptor estando sua ação ligada à regulação do metabolismo energético celular onde pode atuar tanto pela via não genômica citosólica quanto pela via genômica (Glenmark, 2004, Gao et al., 2005; Cantin et al., 2007).

Uma vez que estes receptores exercem ação sob o metabolismo, é sugestivo que a ação da nandrolona seja multifatorial e representada pela capacidade de modificar a expressão de receptores androgênicos, a afinidade e a atividade das vias pós-receptor e ainda, há uma relação direta entre mudanças na sensibilidade adrenérgica do nódulo sino atrial e a presença de esteróides, podendo indicar que na presença de dose supra-fisiológica da nandrolona haja modificações na sensibilidade do coração que podem ser expressos pela elevação na população de receptores β adrenérgicos super-sensibilizando o marca passo cardíaco, como sugerido por Norton et al. (2000).

Considerando que a nandrolona pode elevar padrões metabólicos, outra hipótese em tela está direcionada a uma ação cardiotrópica de fundo bioquímico, uma vez que a nandrolona pode promover ativação das enzimas glicose-6-fosfato, 6-fosfogluconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase presentes no músculo cardíaco. Esta mudança no padrão bioquímico das fibras cardíacas promove inicialmente um aumento na geração de NADPH e conseqüente modificação no tempo de condução do sinal elétrico induzindo sobrecarga na função cardíaca,

elevando o tempo de sístole da câmara ventricular. É importante salientar que a frequência cardíaca também se apresentou elevada indicando mudança na interface sensibilidade/ação do nódulo sino atrial. Recentemente, o grupo de pesquisa do Laboratório de estresse da Faculdade de Odontologia da UNICAMP liderado pela Dra. Fernanda Klein Marcondes observou mudanças no número e atividade dos receptores adrenérgicos presentes no coração no tratamento crônico com nandrolona (comunicação pessoal).

Este estudo foi referendado no estudo de Medei e colaboradores onde foi sugerido que doses supra-fisiológicas de esteróides anabolizantes podem induzir remodelação elétrica principalmente no ventrículo esquerdo promovendo sobrecarga, fato que acompanha nossas observações (Medei et al., 2010, Silva et al., 2010).

Dando segmento ao estudo passou-se a avaliar o comportamento das reservas glicogênicas na presença da nandrolona, iniciando pelo conteúdo ventricular. Neste tecido, foi verificado que na presença de altas doses do agente anabólico houve comprometimento na manutenção das reservas, sendo sugerido que concomitante a sobrecarga da função cardíaca, expressa pelas alterações eletrocardiográficas há maior utilização dos substratos energéticos além de um comprometimento na formação desta importante reserva, acompanhando a sugestão de Cunha (2004) que propôs que altas doses de EAA podem comprometer as reservas glicogênicas cardíacas.

No mesmo sentido de análise, Farias e Anaruma (2008) avaliaram a ação de uma dose supra-clínica de estanozolol sobre o desenvolvimento nos dois tipos de fibras musculares (tipo I e tipo II) do músculo bíceps braquial de ratos sedentários e treinados e não evidenciaram aumento do tamanho da fibra e sim adaptações bioquímicas que não se traduzem pela hipertrofia.

Sabendo-se que o fígado é principal reservatório de glicose e altamente susceptível a substâncias que modificam as reservas energéticas do organismo passou-se a avaliar o comportamento deste reservatório na presença da nandrolona sendo observado que altas doses do esteróide comprometeu a eficiência das dinâmicas responsáveis pela formação/manutenção das reservas glicogênicas. Uma explicação para esta alteração hepática se deve a hepatotoxicidade dos EAA, os quais em altas doses promovem modificações no equilíbrio homeostático dos hepatócitos acompanhado de mudanças nas concentrações plasmáticas das principais enzimas marcadoras de lesão hepática, como demonstrada neste estudo.

Assim, acompanhamos Oliveira (2008) que sugeriu hepatotoxicidade em tratamentos com altas doses de esteróides.

Por outro lado, o comprometimento nas reservas glicogênicas gerado por altas doses de nandrolona, não ocorreu exclusivamente no fígado sendo também observado no tecido muscular indicando a multiplicidade de ações desta molécula. Cabe ressaltar que na dose clínica este perfil de toxicidade não foi observado, reiterando o uso deste esteróide no tratamento curativo.

Acompanhando a proposta, passou-se a avaliar o efeito da imobilização sobre as reservas glicogênicas musculares, uma vez que, esta reserva é marcadora tanto das condições energéticas quanto da condição de performance do músculo esquelético (Sesti, 2006). A avaliação mostrou redução significativa nas reservas de glicogênio e se fundamenta no fato da imobilização estar acompanhada de uma significativa redução na população dos receptores insulínicos, comprometendo a cascata sinalizadora da insulina principalmente aquela ligada às vias citosólicas participantes da síntese de glicogênio, predispondo ao quadro de resistência à insulina e concomitante redução nas reservas glicogênicas (Nicholson et al., 1984, Hirose et al., 2000).

Uma informação adicional e extremamente importante acrescida ao entendimento do modelo de desuso com a órtese de metacrilato de etila, ocorreu a partir de publicações indicando a amplitude das alterações ocorrendo tanto no aspecto histológico quanto fisiológico em músculos imobilizados indicando ainda que as principais alterações morfofuncionais estejam totalmente configuradas que no período de 7 dias pós-imobilização (Durigan, 2006, Durigan et al., 2009).

Segundo Halar e Kathleen (2002), a fraqueza muscular que ocorre conseqüente da imobilização também está associada às seguintes alterações: depleção dos níveis de creatina quinase, redução de sarcômeros em série, redução da força e da resistência à fadiga decorrente da atrofia das fibras I e II e diminuição da função aeróbia.

Frente ao comprometimento nas reservas energéticas induzido pela imobilização, passou-se a avaliar se a nandrolona poderia interferir nas ações deflagradas pela imobilização. Nesta condição experimental observou-se que as reservas glicogênicas dos músculos imobilizados e tratados com o esteroide na dose clínica apresentaram reservas maiores se comparado ao grupo somente imobilizado, indicando ação glicogênica do esteróide acompanhando a sugestão de Cunha et al.,

2005.

Conhecidamente os agentes androgênicos também desempenham uma ação primordial sobre o processo de armazenamento de substratos metabolizáveis. Foi observado que animais castrados apresentam diminuição nas reservas de glicogênio, causada pela redução da função da enzima glicogênio sintase associado ao aumento da atividade da enzima glicogênio fosforilase, assim, a reposição hormonal com dose clínica de testosterona reverte este quadro, estimulando a glicogênese e inibindo a glicogenólise (Ramamani et al., 1999).

Na busca de entender a ação dos esteróides anabolizantes no desuso, diferentes estudos com metodologias distintas têm sido conduzidos e instigado a pesquisa científica. Dentre os estudos realizados com desuso há um modelo de suspensão do membro onde foram testadas diferentes terapias visando o restabelecimento funcional do músculo, tais como: estimulação elétrica, remoção do músculo antagonista ou o uso de esteróides anabolizantes, merecendo destaque que no tratamento com esteróides foi observado redução na tensão máxima de encurtamento indicando melhora nas condições funcionais com preservação no número de miofibrilas (Pette et al., 1973, Bouhlef et al., 2003, Tsika et al., 1987).

De forma antagônica, Witzmann (1988) não observou influência dos esteróides na hipotrofia gerada pela imobilização. Uma possível explicação para a discrepância nas observações se deve a diferenças em padrões de configuração dos estudos existindo variação no gênero, idade, modelo experimentais, dose, modo de administração e tipo de músculo avaliado (Taylor et al., 1999, Fraysse et al., 2000, Marinho, 2006).

Certamente as respostas observadas nas diferentes condições não sejam somente decorrentes de ação direta da nandrolona, mas possivelmente decorra de ação integrada, uma vez que, está demonstrado neste estudo elevação na secreção de insulina. Além disto, há demonstrações indicando que a nandrolona promove elevação na expressão do hormônio de crescimento e do IGF1, eventos associados que potencializam o anabolismo pela via da enzima mTOR como demonstramos neste estudo (Kuhn 2002, Goldspink e Yang, 2004, Gentile et al. 2010, Wu et al., 2010, Serra et al., 2011).

Uma explicação para a ação multifatorial sobre o metabolismo celular se baseia no fato dos esteróides fazerem parte de uma família de receptores de ação nuclear e apresentarem atividade pela via não genômica e pela via genômica.

Inicialmente sabe-se que os EAA são moléculas lipofílicas que atravessam facilmente a membrana plasmática atuando sobre receptores citosólicos, que se encontram estabilizados pelas proteínas de choque térmico, as Hsp (Heat shock protein). Uma vez formado o complexo hormônio-receptor, as Hsp se deslocam até a membrana nuclear, desligam-se do receptor e o complexo adentra ao núcleo e se liga a estruturas denominadas elementos de resposta ao hormônio (*hormone response element* - HRE) no DNA nuclear, promovendo aumento da atividade da RNA-polimerase nuclear nos músculos esqueléticos, aumento da síntese de proteínas específicas e ainda participa da regulação do processo de transcrição ou a repressão de certos genes (Sheffield-Moore e Urban, 2004).

Durante a fase citosólica ainda ligado a Hsp há relações funcionais e integradas com as vias insulínicas preservando as vias metabólicas e anticatabólicas (Gao et al., 2005, Semmelweis et al., 2009)

A descrição da ação molecular da nandrolona infere conceitos indicando que concomitante a ativação dos receptores androgênicos, há ativação de fatores de transcrição que recrutam e ativam células precursoras miogênicas nas fibras musculares, ativando a Myo D que é um fator regulador miogênico envolvido na proliferação e diferenciação das células satélites, com isto exerce ação regenerativa e anticatabólica (Quin et al., 2010, Gentile et al., 2010).

Cabe destacar que os benefícios da nandrolona foram mais eficazes e diferenciados no músculo sóleo que apresenta predomínio de fibras vermelhas e metabolismo oxidativo, esta observação justifica-se pois neste tipo de fibra há maiores populações de receptores insulínicos e estrogênicos além de maior quantidade de DNA (característica de músculos oxidativos) sendo sítio preferencial de ação da nandrolona (Joumaa e Léoty, 2001, Singh et al., 2003)

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a nandrolona na dose de 5mg/kg/semana pode comprometer tanto a homeostasia energética muscular quanto a dinâmica cardíaca. De forma contrária, o esteróide na dose clínica (0,7mg/kg/semana) foi eficiente em prevenir os efeitos deletérios do processo de desuso da musculatura esquelética, exercendo papel anticatabólico, mantendo o padrão anabólico e ao mesmo tempo minimizando o catabolismo,

através de uma ação direta sobre a efetividade das enzimas como a AKT e mTOR, podendo assim auxiliar em muitas praticas clínicas bem como na área desportiva, como nos processo de lesões ósseas, musculares e tendíneas, seguidas de imobilização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Altuwaijri S, Lee DK, Chuang KH, Ting HJ, Yang Z, Xu Q, Tsai MY, Yeh S, Hanchett LA, Chang HC, Chang C. Androgen receptor regulates expression of skeletal muscle-specific protein and muscle cell types. *Endocrine*. 2004, 25 (1): 27-32.

Andersen ML, Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik M. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. Universidade Federal de São Paulo, UNIOFESP, 2007.

Baldochi PJ, Paz K, Prado FO, Martins CHG, Lopes RA, Ribeiro AF, Sala MA. Estudo hematológico em ratos sob a ação de plantas medicinais. Ação da Bixina. *Rev. Bras. Plant. Med.* 2006, 8 (4): 157-161.

Baldwin J, Snow RJ, Gibala MJ, Garnham A, Howarth K, Febbraio MA. Glycogen availability does not affect the TCA cycle or tan pools during prolonged, fatiguing exercise. *J Appl Physiol*. 2003, 94(6): 2181-7.

Barros FG, Menezes RCLC, Silva CA. Efeito do CGT e do clenbuterol no perfil metabólico do músculo esquelético desnervado. *Rev Cien Med*. 2004, 13(4): 327-335.

Booth FW, Seider MJ. Recovery of skeletal muscle after 3 mo. of hind limb immobilization in rats. *J. Appl. Physiol.*, 1979; 47(2): 435-439.

Boschero AC, Delattre E e Santos ML. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomycin. *Horm. Metab. Research*. 1984, 13(9): 531-532.

Bouhlef A, Joumaa HG, Léoty C. Nandrolone decanoate reduces changes induced by hindlimb suspension in voltage-dependent tension of rat soleus muscle. *Jap. J. Physiol*. 2003, 53 (2): 77 – 87.

Cantin L, Faucher F, Couture JF, Jesus KP, Legrand P, Liviu C, Yvon F, Richard L, Shankar M S, Labrie F, Breton R. Structural Characterization of the Human Androgen Receptor Ligand-binding Domain Complexed with EM5744, a Rationally Designed

Steroidal Ligand Bearing a Bulky Chain Directed toward Helix 12. *J. Biol. Chem.* 2007, 282 (42), 30910–30919.

Carson JA, Lee WJ, McClung J, Hand G. Steroid receptor concentration in aged rat hindlimb muscle: effect of anabolic steroid administration. *J. Appl. Physiol.* 2002, 93: 242-250.

Chingui LJ, Branquinho RP, Munhoz MT, Silva CA. Comportamento quimiometabólico do músculo sóleo na fase aguda da imobilização articular. *Fisioterapia e Pesquisa*, 2008, 15(2): 194-9.

Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Salvini TF. A new model of the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res.* 2002, 35: 1329-1332.

Costa ECC, Gonçalves AA, Áreas MA e Morgabel RGB. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. *Arq. Bras. Cardiol.* 2008, 90 (4): 254-260.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.* Arq Bras Endocrinol Metab 1992; 46 (4): 30-36.

Carvalho JB, Ribeiro EB, B. GR, Telles MM, Velloso LA, Gontijo JA, Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats¹. *Diabetes* 2002a; 51: A41

Creutzberg EC, Schols AMWJ. Anabolic Steroids. *Clin Nutr Metab Care.* 1999, 2: 243 - 253.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 785-9.

Cunha TS, Tanno AP, Marcondes FK, Perez SEA, Selistre-Araujo HS. A Administração de nandrolona não promove hipertrofia do músculo sóleo em ratos. *Art. Bras. Endocrinol. Metab.* 2006, 50(3): 532 - 40.

Cunha TS, Cunha NS, Moura MJCS, Marcondes FK. Esteróide anabólico androgênico e sua relação com a prática desportiva. *Brás. Ciênc. Farmac.* 2004, 40 (2): 165-179.

Cunha S, Tanno AP, Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. Influence of high-intensity exercise training and anabolic androgenic steroid treatment on rat tissue glycogen content. *Life Sci.* 2005, 77(9):1030-43.

Dantas JÁ, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.* 2006, 28(2): 165-170.

Dean C. Taylor, Daniel E. Brooks and Jack B. Ryan. Anabolic-Androgenic Steroid Administration Causes Hypertrophy of Immobilized and Nonimmobilized Skeletal Muscle in a Sedentary Rabbit Model. *Am J Sports Med.* 1999, 27: 718-726.

Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ. Imobilização altera o conteúdo de glicogênio e peso muscular de acordo com o período e a posição articular. *Rev Bras Fisioter.* 2005, 9(2): 173-79.

Dias, CNK, Silva, CA; Guirro, R, Cancelliero, KM, Chingui, LJ. Imobilização em flexão plantar do tornozelo induz alteração metabólica em músculo esquelético de ratos. *Fisioter. Bras.* 2005, (6)4: 277-280.

Delfino GB, Silva CA. Comportamento metabólico de músculo esquelético imobilizado de ratos: efeito do sulfato de vanadil. In: IV Semana de reunião da Biologia. Anais., 2005. CD-ROM.

Deschenes MR, Maresh CM, Armstrong LE, Covault J, Kraemer WJ, Crivello, JF. Endurance and resistance exercise induce muscle fiber type specific responses in androgen binding capacity. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 1994, 50(3-4): 175-79.

Di Belo V, Giorgi D, Bianchi M, Bertini A, Caputo MT, Valenti G, et al. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 1999, 31(4): 514-21.

Durigan JLD, Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ. Modelos de desuso muscular e estimulação elétrica neuromuscular: aspectos pertinentes à reabilitação. *Fisio Mov.* 2005, 18(4): 53-63.

Durigan JLQ, Bossi P, Delfino GB, Montebello M I L, Guirro RRJ, Silva CA, Polacow MLO. Metabolic and morphometrical alterations inherent to neuromuscular electric stimulation in the antagonist muscle submitted to ankle joint immobilization. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2009, 52: 85-91.

Durigan JL. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associado à estimulação elétrica neuromuscular. Tese mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – UNIMEP, novembro, 2006.

Failace R. Hemograma – Manual de Interpretação. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 298p.

Falkenberg M, Karlsson J, Ortenwall P. Peripheral arterial thrombosis in two young men using anabolic steroids. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 1997, 13(2): 223- 6.

Farias ALP, Anaruma CA. Estudo morfométrico das fibras do músculo bíceps braquial de ratos submetidos ao exercício de natação aliado ao uso conjugado de dois hormônios esteróides anabolizantes. *Motriz.* 2008, 14(4): 400-407.

Ferrera PC, Putnam DL, Verdile VP. Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology.* 1997, 88(2): 218-20.

Fraysse b, Guillet C, Huchet-Cadiou C, Camerino DC, Gascan H, Leotty C. Ciliary neurotrophic factor prevents unweighting-induced functional changes in rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 2000, 88: 1623-1630.

Fushiki T, Kano T, Inoque K, Sugimoto E. Decrease in muscle glucose transporter

number in chronic physical inactivity in rats. *Am J Physiol.* 1991, 260(3): E403- E410.

Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural Biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* 2005, 105 (9): 3352-3370.

Gentile MA, Nantermet PV, Vogel RL, Phillips R, Holder D, Hodor P, Cheng C, Dai H, Freedman LP, Ray WJ. Androgen-mediated improvement of body composition and muscle function involves a novel early transcriptional program including IGF1, mechanistic growth factor, and induction of β -catenin. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2010, 44 (10):1677 – 1690.

Goldspink G, Yang SW. The splicing of the IGF-1 gene to yield different muscle growth factor. *Advances in Genetics.* 2004, 52:23-49.

Gruber AJ, Pope JR HG. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother. Psychosom.* 2000, 69: 19 –26.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter.* 2004, 8: 21-7.

Graceli JB, Gava PL, Gomes HL, Moscon LM, Endlich PW, Gonçalves WLS, Moysés RB. Chronic Use of Nandrolone Decanoate as Risk Factor for Pulmonary Arterial Hypertension in Wistar Rats. *Rev Bras Med Esporte.* 2010, 16 (1): 46-50.

Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling? *Trends Pharmacol Sci.* 2003, 24:479-485.

Glenmark B, Nilsson M, Gao H, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K, Westblad H. Difference in skeletal muscle function in males vs. Female: role of estrogen receptor- β . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004, 287: 1125-1131.

Halar, EM, Kathleen RB. Imobilidade. *In: DeLisa JA, et al. Tratado de Medicina e Reabilitação: Princípios e práticas, São Paulo, Editora Manole, 2ªed., 2002; 2: 1067-*

87.

Hartgens F, Kuipers, H. Androgenic-Anabolic Steroid Use in Strength Athletes. *Sports Medicine*. 2004, 34(8): 513-54.

Heslinga HJ, Kronnie G, Huijling PA. Growth and immobilization effects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1995, 70(1): 49-57.

Hiipakka RA, Liao S. Molecular mechanism of androgen action. *TEM*. 1998, 9(8): 317-24.

HILDER, T.L. et al. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. **FEBS Lett.** v.553, p. 63–67, 2003

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000, 279(6): 1235-41.

Joumaa WH, Léoty C. Differential effects of nandrolone decanoate in fast and slow rat skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2001, 33(3): 397-403.

Kuipers H, Wijnen JA, Hartgens F, Willems SM. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int. J. Sports Med*. 1991, 12(4): 413-18.

Kutscher EC, Lund BC, Perry PJ. Anabolic steroids: a review for the clinician. *Sports Med*. 2002, 32(5): 285-96.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. *Recent. Prog. Horm. Res.* 2002, 57: 411-434.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227:680-6855.

Larsson CE, Farias MR, Andrade SF, Brito AF. Terapêutica tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. In: ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo, Editora Roca, 2002; 2ª ed. p.116-178.

Liang MT, Paulson DJ, Kopp SJ, Glonek T, Meneses P, Gierke LW, et al. Effects of anabolic steroids and endurance exercise on cardiac performance. *Int. J. Sports Med.* 1993, 14(6): .324-29.

Lieber RL, Friden JO, Hargens AR, Danzig LA, Gershuni DH. Differential response of the dog quadriceps muscle to external skeletal fixation of the kneel. *Muscle Nerve.* 1988, 11: 193-201.

Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Métodos de laboratório aplicados à clínica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 5a ed., 1997.

Lima-Silva AE, Fernandes TC, De-Oliveira FR, Nakamura FY, Gevaerd MS. Metabolismo do glicogênio muscular durante o exercício físico: mecanismos de regulação. *Rev. Nutr.* 2007, 20(4): 417-29.

Lise MLZ, Gama e Silva TS, Ferigolo M, Barros HMT. O abuso de esteróides anabólicoandrogênicos em atletismo. *Rev. Ass. Med. Bras.* 1999, 45(4): 364-370.

Marinho, R.B. Alterações histológicas promovidas pelo uso de esteróides anabólicos androgênicos (decanoato de nandrolona) em ratos. *Scientia.* 2006, 7 (1/2): 89-109.

Matheus, JPC, Gomide, LB, Abrahão, GS, Carvalho, LC, Shimano, AC. Análise do músculo esquelético sob efeitos da imobilização em posições de encurtamento e alongamento. *Ter. man.* 2008, 6(23): 23-27.

Mercier C, Jobin J, Lépine C, Simard C. Effects of hindlimb suspension on contractile properties of young and old rat muscles and the impact of electrical stimulation on the recovery process. *Mech Ageing Dev.* 1999, 106: 305-20.

Marimuthu K, Murton AJ, Greenhaff PL. Mechanisms regulating muscle mass during

disuse atrophy and rehabilitation in humans. J Appl Physiol. 2010, 28, 6 -15.

Marocolo ME, Rodrigues DC, Arantes PC, Takiya CM, Rondinelli E, Goldenberg RC, Carvalho AC, Nascimento JH. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: celular, ionic and molecular mechanism. J. Mol. Cell. Cardiol. 2010, 49 (2): 165- 175.

McCarthy K, Tang ATM; Dalrymple-Hay MJR, Haw MP. Ventricular thrombosis and systemic embolism in bodybuilders: etiology and management. Ann. Thorac. Surg. 2000, 70: 658-60.

Medei E, Marocolo M, Rodrigues Dde C, Arantes PC, Takiya CM, Silva J, Rondinelli E, Goldenberg RC, de Carvalho AC, Nascimento JH. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: cellular, ionic and molecular mechanism. J Mol Cell Cardiol. 2010, 49(2):165-75.

Musacchia XJ, Stefen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. Exerc Sport Sci Ver. 1988, 16: 61-87.

Naraghi MA, Abolhasani F, Kashani I, Anarkooli IJ, Hemadi M, Azami A, Barbarestani M, Aitken RJ, Shokri S. The effects of swimming exercise and supraphysiological doses of nandrolone decanoate on the testis in adult male rats: a transmission electron microscope study. Folia Morphol (Warsz). 2010, 69(3):138-46.

Nelson RW, Couto CG. Distúrbios da micção. In: Medicina Interna de Pequenos Animais. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 48, p.625-633.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Research Report Series - Steroid abuse and addiction. Bethesda: NIDA, apr. 2000. NIH Publication nº 06-3721.

Norton GR, Trifunovic B, Woodiswiss A.J. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. Eur. J. Appl. Physiol. 2000, 81(4):310-6.

Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Nonaka I, Yoshioka T, Yamashita-Goto KI.

Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J Appl Physiol.* 1999, 87(5): 1776-85.

Oliveira GP. Efeito do uso de decanoato de nandrolona em ratos submetidos a treinamento físico. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2008, 72p.

Pelizzari, C, Mazzanti, A, Raiser, A. G; Lopes, S. T. A, Graça, D. L, Ramos, A. T, Salbego, F. Z, Festugatto, R, Beckmann, D. V, Souza, L. B, Cunha, M. G. M. C. M, Santos, R. P, Garmatz, B, Silva, A. P, Sturza, D. A. F. Estimulação elétrica neuromuscular em cães com atrofia muscular induzida. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008, 60(1): 76-82.

Pette D, Smith ME, Staudle HW, Vrbova G. Effect a long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Flugers Arch.* 1973, 338: 257- 272.

Pinheiro DCSN. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos. *Bol. Info. Cobeia.* 1998, 3: 6-9.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RJ, Campos MR e Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisioter.* 2003, 7(1) 57-64.

Pope Jr HG, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry.* 1988, 145: 487-90.

Quin W, Pan J, Bauman WA, Cardozo CP. Differential alterations in gene expression profiles contribute to time-dependent effects of nandrolone to prevent denervation atrophy. *Genomics.* 2010, 11: 596- 613.

Rafacho A, Roma LP, Tabaga SR. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007, 85:536-45.

Ramamani A, Aruldas M.M, Govindarajulu P. Differential response of rat skeletal

muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1999, 77 (4): 300-304.

Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are up regulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2001, 24(7): 893-9.

Rogozkin V. Metabolic effects of anabolic steroid on skeletal muscle. *Med. Sci. Sports.* 1979, 11(2): 160-3.

Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol.* 1993, 265(3): E380-91.

Ryan AJ. Anabolic steroids are fool's gold. *Fed. Proc.* 1981, 40(12): 2682- 8.

Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz. J. Med. Biol.Res.* 1994; 27: 941-957.

Salvini TF. Plasticidade e adaptação dos músculos esqueléticos. In: Marques, A.P. Cadeias musculares. Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. São Paulo: Manole, 2000.

Semmelweis E, Kar IO, Vegytani O. Myoanabolic steroids and selective androgen receptor modulators: mechanism of action and perspectives. *Belkezett.* 2009, 45: 2051–2059.

Silva CA, Pardi ACR, Gonçalves TM, Borin SH. Electrocardiographic Profile and Muscle Glycogen Content of Rats Treated with Nandrolone. *Arq. Cardiol.* 2010,

Sheffield-Moore M, Urban R.G. An overview of endocrinology of skeletal muscle. *Trends in endocrinology and metabolism.* 2004, 15: 110-115.

Spiers AS. Beneficial effects of an anabolic steroid during cytotoxic chemotherapy for

metastatic câncer. J. Med. 1981, 7: 1289-1282.

Sattler FR, Schroeder ET, Dube MP, Jaque SV, Martinez C, Blanche PJ, Azen S, Krauss RM. Metabolic effects of nandrolone decanoate and resistance training in men with HIV. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2002, 283(6): E1214:E22.

Schwarzenbeck A, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ. Avaliação mecânica do músculo esquelético imobilizado. In. Anais do XI Congresso Nacional de Biomecânica, Anais., 2005. CD-ROM

Scott AM, Atwater I e Rojas E. A method for simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia.1981, 21: 470-475.

Serra C, Bhasin S, Tangherlini F, Barton ER, Ganno M, Zhang A, Shansky J, Vandenburgh HH, Travison TG, Jasuja R, Morris C. The Role of GH and IGF-I in Mediating Anabolic Effects of Testosterone on Androgen-Responsive Muscle. Endocrinology. 2011,152(1):193-206.

Shahidi NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. Clin. Therapeutics. 2001, 23(9): 1355-90.

Singh R, Artaza JN, Taylor W, Gonzáles NF Bhasin S. Androgen Strimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells to an androgen receptor mediated pathway. Endocrinology. 2003, 144 (11): 5081-5088.

Silva PRP, Danielski R, Czepielewski MA. Esteróides anabolizantes no esporte. Rev Bras Med Esporte. 2002, 8(6): 235-43.

Silva CA, Guirro RR, Polacow ML, Durigan JL. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. Braz J Med Biol Res. 2006, 39(7):979-85.

Simonson E, Kearns WM, Enger M. Effects of methyl testosterone treatment on muscular performance and the central nervous system of older men. J. Clin.

Endocrinol. Metab. 1974, 4(11): 528-34.

Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. J. Appl. Physiol. 1970, 28: 234-6.

Snyder PJ. Androgens. The pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw Hill, 2001; 10^a ed: 1635-1648.

Tamaki T, Uchiyama S, Uchiyama Y, Akatsuka A, Roy RR, Edgerton R. Anabolic steroids increase exercise tolerance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2001, 280: E973-81.

TANAKA, T.; KARIYA, Y.; HOSHINO, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. J. Orthop. Sci. v.9, p.76-85, 2004.

Testa JR, Belaacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. PNAS. 2001, 98(20): 10983-5.

Thomas G, Hall MN. TOR signaling and control of cell growth. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 782-7.

Tsika RW, Herrick R, Baldwin KM. Effect of anabolic steroids on skeletal muscle during hindlimb suspension. J. Appl. Physiol. 1987, 63: 1385- 1389.

Tylicki A, Kawalko A, Sokolska J, Strumilo S. Effect of anabolic steroid nandrolone deaconate on enzymes in the heart, liver and muscle of rats and rat's electrophysiology. Horm Metab Res. 2007, 39(4): 268-72.

Vieira RP. Efeito do decanoato de nandrolona sobre o fígado de ratos [dissertação na internet]. Vale do Paraíba: Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP; 2003 [acesso 2009 junho 09]. Disponível: <http://biblioteca.univap.br/dados/000001/0000015D.pdf>.

Zao J, Yuangfei Z, Zhao W, Young W, Jiagping P, Bauman WA, Cardozo C. Effects

of nandrolone and denervation atrophy dependent upon time after nerve transection. *Muscle and Nerve*. 2008, 37: 42 -49.

Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*. 2007, 69(2):310-21.

Wilson JD. Androgen abuse by athletes. *Endocr. Rev.* 1988, 9(2): 181-99.

Yesalis CE. Anabolic steroids in sport and exercise. Champaign, IL, Human Kinetics. 2^aed, 1993.

White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: S2-S17

Wilmore, JH; Costill, DL. *Fisiologia do esporte e do exercício*. Champaign: Human Kinetics, 1999.

Wu Y, Bauman WA, Blitzer RD, Cardozo C. Testosterone-induced hypertrophy of L6 myoblasts is dependent upon Erk and mTOR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 400(4):679-83.

9. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
progg@power.ufscar.br - www.progg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 015/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 7ª. Reunião, ocorrida em 20/06/2006, **APROVOU** o trabalho intitulado Estudo Metabólico, morfométrico e mecânico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associado à estimulação elétrica e a tratamentos farmacológicos, elaborado por Profª. Dra. Maria Luiza Ozores Polacow, procedente da Universidade Metodista de Piracicaba/Departamento de Fisioterapia. Protocolo CEEA nº 010/2006.

São Carlos, 30 de agosto de 2006.



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

10. ANEXO – PUBLICAÇÃO DE DADOS PARCIAIS