

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA - UNIMEP
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FACIS**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**A estimulação elétrica na expressão gênica do myoD, miostatina e
atrofina-1 do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos**

Silvana Coca Lima

2007

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SILVANA COCA LIMA

**A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA EXPRESSÃO
GÊNICA DO MYOD, MIOSTATINA E
ATROGINA-1 DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO
DESNERVADO DE 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: Intervenção Fisioterapêutica no Sistema Neuromuscular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Balisardo Minamoto.

PIRACICABA

2007

Ficha Catalográfica

Lima, Silvana Coca.

A estimulação elétrica na expressão gênica do myoD, miostatina e atrogina-1 do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos. Piracicaba, 2007.

55 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Balisardo Minamoto.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

1. Músculo esquelético 2. Desnervação 3. Expressão gênica I. Minamoto, Viviane Balisardo. II. Universidade Metodista de Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. III Título.

Os membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **SILVANA COCA LIMA** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, em Sessão Pública realizada no 07 de fevereiro de 2007, consideraram o(a) candidato(a) aprovado(a).

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Viviane Balisardo Minamoto - UNIMEP

Profa. Dra. Rosangela Verlengia UNIMEP

Profa. Dra. Maria Julia Marques - UNICAMP

Dedico este trabalho aos melhores pais do mundo, os meus: Veríssimo e Vertudes, pelo apoio incondicional sempre, pela paciência, amor e pelo ensino diário.

Agradecimentos

A Deus, pelos inúmeros presentes que me dá a cada dia.

Aos meus pais, pela vida e por abrir as portas diante das oportunidades.

Aos meus queridos irmãos e cunhadas.

Aos meus sobrinhos lindos, Gú, Rafa e Vi, que nos enchem de alegria, barulho e travessuras.

Aos meus amigos, de longe, de perto, de todas as horas.

À equipe de trabalho, que ajudou na realização dos experimentos, MUITO OBRIGADA!!!

A todos amigos de mestrado, pela convivência neste período.

À minha orientadora Vivi, pelo conhecimento, confiança e oportunidades.

Aos professores do programa, por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar.

À Prof^a Dr^a Rosana, pelo trabalho conjunto e por nos “adotar” por alguns meses.

Ao Prof^o Dr Rinaldo, pelo desenvolvimento de trabalhos paralelos.

Aos funcionários da Pós-graduação e laboratórios, em especial à Miriam, pela disposição e prontidão.

À Prof^a Dr^a Tânia Salvini, pelo uso do Laboratório de Plasticidade Muscular da Universidade Federal de São Carlos.

À Sabrina, pelo imenso auxílio dentro e fora do laboratório.

À Prof^a Dr^a Rozângela Verlengia e Prof^a Dr^a Maria Júlia Marques pelas sugestões na redação final do trabalho.

À FAPESP (05/52720-0), FAP-UNIMEP (384-05) e CAPES/Prosup.

Epígrafe

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

A lesão do nervo periférico implica em alteração na expressão de genes específicos do músculo, como o myoD, atuante na ativação de células satélites, a miostatina, potente reguladora da massa muscular e a atrogina-1, que participa da degradação protéica. A estimulação elétrica (EE) é um recurso empregado na prática clínica para tratamento de músculos desnervados. O objetivo do presente estudo foi analisar se a estimulação elétrica fásica é capaz de minimizar a perda de massa muscular e diminuir a expressão do myo-D, miostatina e atrogina-1 do músculo gastrocnêmio (G) desnervado. Além disso, foi analisado se a frequência de aplicação (diária ou alternada) resulta em diferentes respostas das variáveis analisadas. Para isso, 20 ratos *Wistar* (180 ± 20 g) foram igualmente divididos em grupos: controle (C); desnervado (D), desnervado + eletroestimulado diariamente (EED) (5x/semana) e desnervado + eletroestimulado em dias alternados (EEA) (3x/semana). Para procedimento de desnervação, EE e coleta do músculo os animais foram profundamente anestesiados. A desnervação foi realizada por esmagamento do nervo isquiático, e após 24 horas iniciou-se a EE utilizando o aparelho DUALPEX 961 – Quark (corrente bifásica, quadrática, simétrica, T=3ms, f=10Hz e i=5mA, aumentando 1mA a cada 5min, t=30min). Após 10 dias de EE, o músculo G foi dissecado, pesado e a porção distal da cabeça medial, mantida em freezer a -70° C. A quantificação de mRNA do myoD, miostatina e atrogina-1 foi realizada por amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. Para análise estatística utilizou-se o teste Shapiro-Wilk, seguido pela One-way (ANOVA) e teste de Tukey ($\alpha= 5\%$). Os resultados do presente estudo mostraram que a massa muscular relativa nos grupos tratados com EE não diferiram do grupo desnervado (D: $0.159 \pm 0.012\%$; EED: $0.146 \pm 0.013\%$; EEA: $0.152 \pm 0.023\%$, $p>0.05$). Houve aumento da expressão do myoD nos grupos eletroestimulados quando comparados ao D (D:18 vezes, EED: 23 vezes, EEA: 27 vezes, $p<0.05$). A expressão da miostatina nos grupos eletroestimulados foi maior que no grupo D (D: 2.5 vezes, EED: 4.2 vezes, EEA: 5.6 vezes, $p<0.05$). Observou-se grande aumento na expressão da atrogina-1 nos grupos desnervados quando comparados ao grupo C, e que a EE aplicada diariamente foi capaz de diminuir a expressão da atrogina-1 (D: 81 vezes; EED: 68 vezes, EEA: 97 vezes, $p<0.05$). Diferente dos resultados esperados, a EE aumentou a transcrição dos genes do myoD, miostatina e atrogina-1 e não influenciou na massa muscular de músculo desnervado. Conclui-se que a frequência de tratamento imposta ao músculo influencia na expressão de genes específicos do músculo, uma vez que a aplicação de estimulação elétrica em dias alternados resultou em maior nível de expressão dos genes da miostatina, myoD e atrogina-1 quando comparada com a estimulação aplicada diariamente. O tratamento diário mostrou ser um protocolo mais efetivo do que o tratamento em dias alternados, uma vez que o mesmo diminuiu a expressão da atrogina-1, gene relacionado com a instalação da atrofia muscular.

Palavras chaves: músculo esquelético, denervação, estimulação elétrica, expressão gênica.

ABSTRACT

Peripheral nerve injury causes alterations in the expression of specific muscle genes as myoD, myostatin and atrogina-1, that are involved in the satellite cells activation, muscle mass regulation and protein degradation, respectively. Electrical stimulation (ES) is used as a treatment form of denervated muscle. The aim of this study was to analyse if phasic ES can minimize the decrease of muscle mass and gene expression of myoD, myostatin and atrogin-1 of rat denervated gastrocnemius muscle (GM). Besides, the treatment frequency was analysed, comparing the use of daily and alternated ES. Twenty *Wistar* rats (180 ± 20 g) were equally divided into groups: control (C), denervated (D), denervated + daily electrical stimulation (DES; 5x/ week) and denervated + alternated electrical stimulation (AES; 3x/week). For procedures of denervation, electrical stimulation and muscle collection the animals were deeply anesthetized. Denervation was performed by sciatic nerve crush, and ES began 24 hour later using a DUALPEX 961 – Quark (symmetrical biphasic quadratic impulse, $T=3$ ms, $f=10$ Hz, $i=5$ mA, increasing 1mA each 5 min, $t=30$ min). After 10 days of ES, the distal region of medial GM was dissected, weighted and kept in freezer at -70° C. mRNA quantification of myoD, myostatin and atrogin-1 was done by polimerase chain reaction (PCR) amplification in real time. Shapiro-Wilk test, followed by ANOVA One-way with Tukey test ($\alpha= 5\%$) were used to compare the results. The results of this study showed that relative muscle mass of ES groups did not differ of D group (D: $0.159 \pm 0.012\%$; DES: $0.146 \pm 0.013\%$; AES: $0.152 \pm 0.023\%$, $p>0.05$). MyoD expression was increased in ES groups when compared to D (D: 18 folds, DES: 23 folds, AES: 27 folds, $p<0.05$). Myostatin expression was higher on ES groups when compared to D (D: 2.5 folds, DES: 4.2 folds, AES: 5.6 folds, $p<0.05$). Atrogin-1 expression was increased on denervated groups when compared to C and ES daily applied was able to decrease atrogin-1 expression (D: 81 folds; DES: 68 folds, AES: 97 folds, $p<0.05$). Different of expected results, it was observed that ES increased gene transcription of myoD, myostatin and atrogina-1 and did not influence the muscle mass of denervated muscle. We concluded that treatment frequency imposed to muscle is related to muscle specific gene expression, once ES applied on alternated days resulted higher level of expression of myostatin, myoD and atrogina-1 when compared to daily ES. Daily ES showed to be a more effective treatment protocol than alternated ES as it decreased the expression of atrogina-1, gene closed related to muscle atrophy.

Key words: skeletal muscle, denervation, electric stimulation, gene expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
	2.1 Músculo esquelético e expressão gênica	11
	2.1.1 MyoD	11
	2.1.2 Miostatina	14
	2.1.3 Atrogina-1	20
	2.2 Alteração da atividade neuro-muscular e expressão gênica	22
3	OBJETIVO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
	4.1 Animais e grupos experimentais	27
	4.2 Protocolo para desnervação por esmagamento do nervo isquiático	27
	4.3 Protocolo para estimulação elétrica	28
	4.4 Procedimento para coleta do músculo	30
	4.5 Extração de RNA total	30
	4.6 Transcrição Reversa (RT)	31
	4.7 Primers	31
	4.8 PCR em tempo real	32
	4.9 Análise estatística	33
5	RESULTADOS	34

5.1	Massa muscular	34
5.2	Expressão gênica da miostatina	35
5.3	Expressão gênica da atrogina-1	36
5.4	Expressão gênica da miostatina	37
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Quando um músculo perde sua inervação, ele deixa de receber estímulos para contração, necessários para manutenção de suas funções. A resposta do músculo à desnervação compreende degeneração das fibras musculares, alteração no balanço entre síntese e degradação protéica, resultando em atrofia (Eberstein e Eberstein, 1996), proliferação do tecido conjuntivo intramuscular (Salonen et al., 1985), assim como diminuição ou perda da capacidade de gerar força (Dow et al., 2006).

A desnervação também promove aumento na expressão de genes específicos do músculo, como o myoD, miostatina e atrogina-1 (Wing, Haas e Goldberg, 1995; Ishido, Kami e Masuhara, 2004; Zhang et al., 2005). O myoD está relacionado ao desenvolvimento e regeneração do músculo esquelético, atuando na proliferação e diferenciação das células musculares na fase embrionária e regenerativa (Tapscott, 2005). Já a miostatina, responsável pelo trofismo muscular, é considerada um potente regulador negativo da massa muscular (McPherron, Lawler e Lee, 1997). A atrogina-1, presente em casos de atrofia muscular de diversas origens, tem importante função na degradação de proteínas, influenciando no balanço entre síntese e degradação protéica (Lecker et al., 2004).

A estimulação elétrica é um recurso usado por profissionais da fisioterapia como tratamento de músculos com diminuição e/ou ausência da atividade contrátil. Apesar da estimulação elétrica crônica (aplicada por período superior à 6h/dia, normalmente por eletrodos implantados no músculo) ser comumente estudada após lesão nervosa, pouco se sabe sobre os efeitos da

estimulação elétrica fásica (aplicada apenas por alguns minutos/dia, e utilizando-se de eletrodos de superfície), freqüentemente utilizada na clínica. Assim, o conhecimento dos efeitos celulares e moleculares decorrente da aplicação desse recurso poderá ajudar o profissional de reabilitação no esclarecimento da ação da estimulação elétrica no músculo desnervado.

O presente trabalho teve como objetivo investigar se a estimulação elétrica fásica é capaz de minimizar a diminuição de massa muscular decorrente da desnervação, assim como reduzir a transcrição dos genes do myoD, miostatina e atrogina-1, conhecidos por terem seus níveis elevados após interrupção da atividade elétrica. Adicionalmente, foi analisado se a freqüência em que o tratamento é realizado (diariamente ou em dias alternados) interfere nas variáveis estudadas, a fim de proporcionar subsídios para escolha de parâmetros da estimulação elétrica no tratamento de músculos desnervados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Músculo esquelético e expressão gênica

O músculo esquelético é um dos melhores exemplos de tecido que possui habilidade de adaptação diante de diferentes estímulos impostos. Tal processo envolve mudanças quantitativa e qualitativa na expressão de genes específicos do músculo (Goldspink, 2002). A alteração do sinal elétrico regula a transcrição de alguns genes musculares como o myoD, relacionada com o desenvolvimento e regeneração (Eftimie, Brenner e Buonanno, 1991; Ishido, Kami e Masuhara, 2004), a miostatina, reguladora do trofismo (Zhang et al., 2005) e a atrogina-1, envolvida com a degradação protéica (Wing, Haas e Goldberg, 1995; Bodine et al., 2001).

2.1.1 MyoD

Os fatores regulatórios miogênicos (MRF, *myogenic regulatory factors*) são fatores de transcrição específicos do músculo que, quando expressos, são capazes de transformar células indiferenciadas em células musculares (Tapscott, 2005). São também chamados de família myoD, e tem como membros a miogenina, o myoD (*myogenic differentiation*), o myf-5 (*myogenic factor 5*) e o MRF4 (*myogenic regulatory factor 4*). Em 1987, Davis, Weintraub e Lassar identificaram e isolaram o primeiro fator miogênico, o qual denominaram myoD. Os outros três fatores (miogenina, myf-5 e MRF4) foram descritos posteriormente (Edmonson e Olson, 1989; Wright, Sassoon e Lin, 1989; Braun et al., 1989; Rhodes e Konieczny, 1989). Segundo Weintraub et al. (1991), uma variedade de

células pode ser convertida em mioblastos pela ação do myoD, como fibroblastos, células adiposas, neuroblastos, hepatócitos, condrócitos, entre outras.

A estrutura dos membros da família myoD é semelhante, com duas regiões funcionais, um domínio básico que medeia a ligação entre o fator miogênico e uma região específica do DNA, conhecida como E-box (CANNTG), e um domínio hélice-alça-hélice (HLH, *hélix-loop-helix*) necessário para heterodimerização, ou seja, a combinação dos membros da família myoD com outras proteínas diferentes. Por esse motivo, tais proteínas são também conhecidas como proteínas básicas HLH (Carlsen e Gundersen, 2000).

Durante a formação do músculo esquelético ocorre uma série de eventos como determinação, diferenciação e maturação das células musculares. O mioblasto é a célula precursora muscular, de origem mesodérmica, que por um conjunto de alterações moleculares, celulares e morfológicas, forma uma complexa rede molecular que atua na formação da fibra do músculo esquelético (Ludolph, 1995; Chargé e Rudnicki, 2004). Estudos referentes aos MRFs demonstram que a expressão desses genes é diferente espacial e temporalmente durante a miogênese. O myoD e myf-5, também denominados fatores primários, são expressas na fase de determinação, onde ocorre o comprometimento das células proliferativas dos somitos para a linhagem miogênica. A expressão do myf-5 é observada no somito dorso-medial, que mais tarde dará origem à musculatura intercostal e do tronco, enquanto que o myoD é expressa no somito dorso-lateral, que posteriormente formará os músculos da parede corporal e dos membros. A expressão do myoD e myf-5 é o passo chave que resulta no comprometimento das células do somitos para a linhagem muscular, uma vez que

na ausência de ambos os genes não há formação de mioblastos, e conseqüentemente, da musculatura esquelética (Berkes e Tapscott, 2005).

As células comprometidas, os mioblastos, podem proliferar-se, diferenciar-se em miócitos e fundir-se, formando miotubos, e após maturação, miofibras multinucleadas. A miogenina e o MRF4 aparecem nessa etapa secundária, de diferenciação (Arnold e Braun, 2000). Após esses eventos, genes específicos do músculo começam ser expressos, como a cadeia pesada de miosina (MHC, *myosin heavy chain*).

Vários são os fatores que regulam a expressão do myoD, como hormônios (Hughes et al., 1993; Kraus e Pete, 1997), inervação (Eftimie, Brenner e Buonanno, 1991; Hughes et al., 1993), desnervação (Sakuma et al., 1999; Walters, Stickland e Loughna, 2000; Hyat et al., 2003; Ishido, Kami e Masuhara, 2004), imobilização (Loughna e Brownson, 1996) e sobrecarga mecânica (Sakuma et al., 1999).

Além de ter importante papel no desenvolvimento, o myoD também é fundamental na regeneração do músculo esquelético. Após lesão, o processo de regeneração muscular tem início com a ativação das células satélites, que são células indiferenciadas situadas entre a lâmina basal e o sarcolema de fibras maduras, e que em condições normais permanecem em estado quiescente (Schultz e McCormick, 1994). Elas são ativadas em situações onde há a necessidade de novos mioblastos para crescimento ou regeneração muscular, ou seja, após traumas, exercícios excessivos (principalmente excêntrico), exposição à substância tóxica, estiramento, desnervação, doenças degenerativas, entre outros (Lieber, 2002). Uma vez ativadas, o processo de proliferação e diferenciação das células satélites é semelhante ao das células musculares no

desenvolvimento embrionário, e os MRFs têm função igualmente importante (Chargé e Rudnicki, 2004). O myoD, assim como a miogenina, está localizado no núcleo da célula. Eles são conhecidos como marcadores do crescimento muscular e hipertrofia, pois modulam a divisão das células satélites e sua incorporação como novo núcleo dentro da fibra adulta (Hyatt et al., 2003).

O papel que os MRFs exercem no músculo esquelético na fase embrionária é bem estabelecido, porém ainda não estão totalmente esclarecidas suas funções na fase pós-natal. Os MRFs (principalmente o myoD e a miogenina) têm sido apontados como responsáveis por influenciar o fenótipo do músculo esquelético na fase pós-natal (Flück e Hoppeler, 2003). Há evidências que o padrão de expressão e nível de proteína dos MRFs diferem entre músculos de diferentes fenótipos, sendo o myoD expresso predominantemente em fibras de contração rápida, enquanto a miogenina, em fibras de contração lenta (Voytik et al., 1993; Sakuma et al., 1999).

Em situações de desnervação, a expressão desses genes é semelhante à de músculos normais, ou seja, maior expressão do myoD em músculos com predomínio de fibras rápidas e maior expressão da miogenina em músculos com predomínio de fibras lentas (Walters, Stickland e Loughna (2000).

2.1.2 Miostatina

A super família de fatores de crescimento transformantes beta (TGF- β , *transforming growth factor beta*) é formada por grande número de fatores de crescimento e diferenciação e tem importante papel na regulação do desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase de diversos tecidos (Thomas et al., 2000).

A miostatina ou fator do crescimento e diferenciação 8 (GDF-8, *growth and differentiation factor 8*) é um dos membros da super família TGF- β , e tem sido estudada devido à sua relevante função na regulação da massa muscular esquelética. Esse fator foi descrito pela primeira vez por McPherron, Lawler e Lee (1997), quando os autores estudaram animais com ausência de GDF-8 e observaram aumento de 2 a 3 vezes na massa muscular esquelética quando comparados a animais normais. Esses resultados mostraram que a miostatina atua especificamente como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. Tal aumento na massa muscular parecia ser resultado da combinação de hipertrofia e hiperplasia muscular, e era independente de sexo ou idade do animal.

A formação do músculo esquelético é dependente de fatores positivos e negativos de crescimento, e o balanço entre eles resulta na quantidade ideal de tecido muscular a ser formado. Os MRFs são fatores considerados positivos, atuam nos processos de determinação e diferenciação muscular e são capazes de transformar células indiferenciadas em mioblastos, originando assim as fibras musculares (Weintraub et al., 1991).

Já a miostatina é considerada um fator negativo, pois diminui a expressão dos reguladores miogênicos myoD, myf-5 e miogenina. Há evidências que a miostatina é capaz de inibir a miogênese por sua ação na proliferação (Thomas et al., 2000) e diferenciação dos mioblastos (Rios et al., 2002; Langley et al., 2002).

O fato da ausência da miostatina ser capaz de aumentar a massa muscular por hipertrofia e hiperplasia sugere duas ações distintas: regulação do número de fibras durante o desenvolvimento embrionário e regulação do

crescimento muscular na fase pós-natal (Lee, 2004). Thomas et al. (2000) investigaram o papel da miostatina no controle da proliferação dos mioblastos em cultura de células da linhagem C2C12 e concluíram que a miostatina inibe a proliferação dos mesmos e ainda, que o efeito desta inibição é reversível, pois ao retirá-la do meio de cultura observou-se desenvolvimento celular normal. Os autores relataram ainda que a ação da miostatina é dose-dependente, pois diferentes concentrações de miostatina aplicadas ao meio promoveram diferentes respostas no desenvolvimento dos mioblastos.

Para determinar o efeito da miostatina na diferenciação dos mioblastos, Langley et al. (2002) realizaram cultura celular com células da linhagem de fibroblastos C2C12 em meio propício para diferenciação, no qual variadas concentrações de miostatina foram avaliadas. Após três dias de incubação nesse meio, as células que receberam altas doses de miostatina não mostraram formação de miotubos, nem expressão de MHC. O tratamento com baixas concentrações de miostatina apresentou formação de alguns miotubos, e as células-controle, não tratadas com miostatina, apresentaram extensa formação de miotubos multinucleados, positivos para expressão de MHC. Esses resultados mostram que a miostatina inibe a diferenciação de mioblastos promovido pelo myoD na linhagem C2C12, e, como no processo de proliferação, a inibição é dose-dependente.

Ambos os estudos citados anteriormente também avaliaram os efeitos da miostatina em mioblastos fetais bovinos e mostraram que a ação na proliferação e diferenciação não é restrita apenas para células C2C12 *in vitro*, pois os mesmos efeitos foram verificados em células oriundas de animais (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002).

Já no músculo adulto, a ação da miostatina parece ser via células satélites. O fato da ausência da miostatina causar aumento no tamanho da fibra sugere que sua ação ocorre por bloqueio da diferenciação e/ou proliferação das células satélites, processo semelhante ao observado na formação do músculo no período embrionário. Uma possível hipótese é que a função da miostatina em animais adultos é manter as células satélites em estado quiescente, e em circunstâncias de crescimento e regeneração, a atividade da miostatina é inibida, permitindo que as células satélites sejam ativadas (McCroskery et al., 2003).

A ausência de miostatina na fase embrionária resulta em fenótipo de músculo mais rápido e glicolítico, independente do músculo ter característica rápida ou lenta, sendo observado maior proporção de isoformas rápida de cadeia pesada de miosina (MHC) em animais mutantes quando comparados com normais. Em animais adultos, a inibição da miostatina parece não causar transformação do músculo para um fenótipo mais rápido e glicolítico. Isso sugere que a miostatina tem um papel crítico em regular a formação, proliferação e diferenciação de mioblastos fetais e fibras pós-natal (Girgenrath, Song e Whittemore, 2005).

A miostatina é expressa quase que exclusivamente no tecido muscular, embora níveis de mRNA da miostatina também foram detectados no tecido adiposo (Dominique, 2006). Em estudo prévio, Lee e McPherron (2001), analisaram a ação da miostatina em animais idosos e verificaram que, além de ter ação no tecido muscular, a miostatina interfere no metabolismo de gordura e função dos adipócitos, mesmo em condições normais de temperatura e ingestão alimentar. Ratos com diminuição da atividade da miostatina tiveram redução significativa na massa de gordura, mais pronunciada com o aumento da idade.

Esses autores ainda demonstraram que a diminuição da atividade da miostatina tem efeito metabólico benéfico em dois modelos de ratos mutantes, para diabetes tipo II e obesidade. Os resultados encontrados concluíram que a diminuição da atividade da miostatina pode suprimir parcialmente o acúmulo de gordura e o desenvolvimento de hiperglicemia nesses animais transgênicos. Embora o mecanismo pelo qual a miostatina regula o metabolismo de gordura, principalmente em humanos, não esteja claro, esses resultados levantam a possibilidade de que inibidores de miostatina podem ser usados para tratamento ou prevenção de distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes tipo II.

O conhecimento da função da miostatina tem levantado muitas questões importantes sobre o controle do crescimento muscular, não só em relação ao tamanho do tecido muscular em geral, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias para aplicações terapêuticas e para criação de animais (Lee, 2004).

Mutações na seqüência codificada pelo gene da miostatina foram encontradas em algumas raças de bovinos (Belgian Blue, Asturiana, Limousine, Piamontesa, entre outras) conhecidas pelo fenótipo de hipertrofia exacerbada da massa muscular esquelética. Animais dessas raças representam grande significância econômica, já que apresentam aumento de aproximadamente 50% na massa muscular quando comparados com animais sem mutação (Gonzalez-Cadavid, 2004). O gene da miostatina foi também estudado em várias outras espécies animais mostrando ter alta homologia, ou seja, a seqüência no domínio C-terminal é idêntica entre humano, rato, porco, cachorro, galinha e peru. Também foi identificado em espécies de peixe, porém a seqüência protéica difere dos vertebrados (Matsakas, 2005).

Similar a outros membros da família TGF- β , a miostatina é sintetizada como uma proteína precursora que, após processos proteolíticos, geram a molécula ativa. Várias proteínas são conhecidas por sua capacidade de ligação e inibição à miostatina, entre elas, a folistatina, gene relacionado à folistatina (FLRG, *follistatin like related gene*) e propeptídeo. Assim, a análise do mRNA da miostatina não reflete seguramente a quantidade de proteína funcional (Lee, 2004).

A folistatina é uma proteína que pode ligar-se não só a miostatina, como também a outros membros da família TGF- β . Estudos sugerem que a folistatina atua como antagonista da miostatina e tem importante papel na modulação da atividade da miostatina *in vivo*. Estudos genéticos em ratos mostram que o aumento da expressão da folistatina no músculo pode causar grande aumento no crescimento muscular, podendo ser comparado a animais nulos de miostatina (Lee e McPherron, 2001).

Devido a miostatina agir como reguladora negativa da massa muscular, e sua inibição causar explícito aumento na musculatura esquelética e na força muscular, existe grande interesse na manipulação desse gene em terapias em casos de doenças crônicas e degenerativas que provocam perda de massa muscular, como por exemplo, AIDS, caquexia, *diabetes mellitus*, esclerose, e no próprio envelhecimento. Também não é surpresa que companhias farmacêuticas desenvolvam estratégias para inibir a ação da miostatina e utilizá-la para melhora da performance física nos esportes. O fato da miostatina e seus inibidores serem expressos naturalmente pelo organismo dificulta a detecção de tal recurso como *doping* (Matsakas, 2005).

2.1.3 Atrogina

Na célula, a quantidade de proteínas não é determinada apenas pela síntese, mas também pela taxa de degradação, processo importante para regulação celular. Algumas proteínas são rapidamente degradadas, enquanto outras têm meia-vida longa, dependendo de sua função. Além disso, proteínas danificadas ou que sofreram algum erro na fase de tradução são reconhecidas e rapidamente degradadas, evitando assim intercorrências durante a síntese protéica. Em células eucarióticas há duas vias principais que medeiam a degradação de proteínas: a via ubiquitina-proteossomo e a via da proteólise lisossomal (Cooper, 2002).

Os proteossomos são complexos protéicos que estão presentes em grande número na célula e atuam em proteínas que foram marcadas para degradação pela ubiquitina (Alberts et al., 1997). A ubiquitina é um peptídeo que pode ser conjugado a substratos protéicos específicos, resultando numa reação em cadeia: uma segunda ubiquitina é ligada à primeira e uma terceira, ligada à segunda, e assim é construída uma cadeia de poliubiquitina no substrato protéico. Essa proteína, marcada pela cadeia de poliubiquitina, é então transportada para o proteossomo, onde acontece a proteólise, resultando em pequenos peptídeos (Glass, 2003).

O processo de ubiquitinação ocorre por etapas: primeiro a ubiquitina é ativada por uma enzima de ativação (E1), posteriormente ela é transferida a uma segunda enzima, de conjugação (E2), e finalmente a transferência da ubiquitina para a proteína alvo é mediada pela enzima E3, ou ubiquitina de ligação. As ubiquitinas de ligação (E3) são quem oferecem especificidade ao substrato (Cooper, 2002).

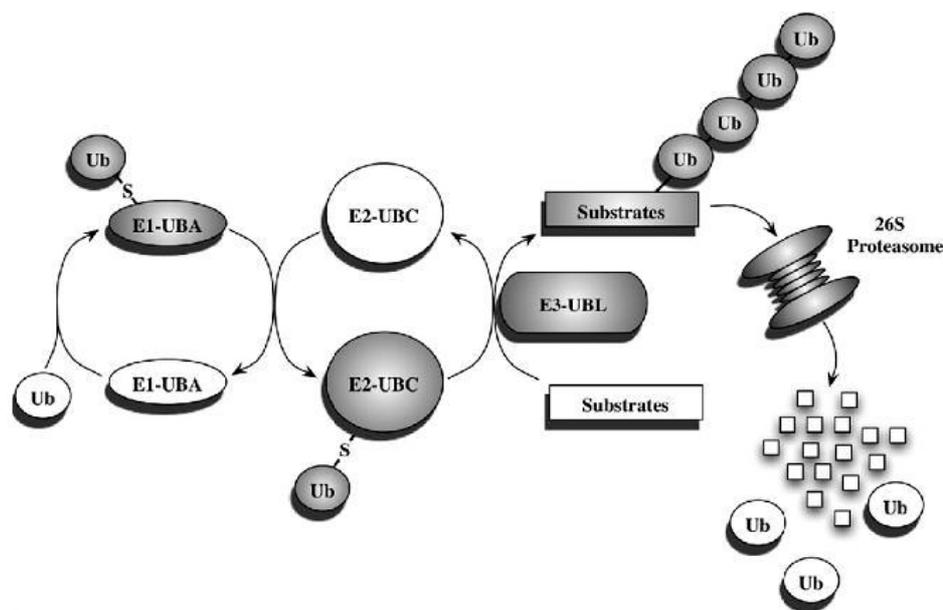


Figura 1 – Via ubiquitina-proteossomo. Diagrama que ilustra a família de proteínas que compõe a via e suas interações. Ub, ubiquitina; E1-UBA, proteína E1 ou ubiquitina de ativação; E2-UBC, proteína E2 ou ubiquitina de conjugação; E3-UBL, proteína E3 ou ubiquitina de ligação (Fonte: Reid, 2005).

A atrogina-1, também conhecida como *MAFbx* (*muscle atrophy F-box*), apresenta um domínio F-box, o qual caracteriza uma classe de proteínas ubiquitina-ligase (E3), chamadas de complexo *SCF* (proteína *Skp1*, proteína *Cal*, proteína *Ring Fingers* e proteína *F-Box*) (Deshaies, 1999). O domínio *F-box* desempenha papel primordial na ligação da proteína que será ubiquitinada e posteriormente degradada (Lecker, 2003).

Em casos de atrofia, a síntese de proteínas musculares está diminuída e a taxa de degradação, elevada consideravelmente, levando ao acelerado processo de perda de proteína muscular. A via de degradação da ubiquitina-proteossomo é ativada quando há atrofia decorrente das mais diversas origens, como câncer (Llovera et al., 1994; Baracos et al., 1995), insuficiência renal crônica (Lecker et al., 2004), imobilização (Taillandier et al., 1996; Bodine et al., 2001), desnervação (Medina, Wing e Goldberg, 1995; Bodine et al., 2001), diabetes (Price et al., 1996), tratamento com corticóides (Auclair et al., 1997), ausência de

descarga de peso no membro posterior (Bodine et al., 2001). Em todos esses casos foi observada atrofia muscular resultante de processo semelhante de degradação protéica (Lecker et al., 1999).

2.2 Alteração da atividade neuro-muscular e expressão gênica

A atividade elétrica é o primeiro estímulo neural a regular massa muscular, a expressão dos MRFs e a atividade celular no músculo esquelético (Hyatt et al., 2003). Mudanças na expressão do myoD e miogenina foram observadas em várias situações experimentais onde a interação entre nervo e músculo encontra-se alterada, como desnervação, reinervação e paralisia induzida por toxina. Isso sugere que a atividade elétrica pode afetar seletivamente os níveis de mRNA do myoD (Witzemann e Sakmann, 1991).

Com intuito de verificar a influência da inervação na expressão da miogenina e myoD, Eftmie, Brenner e Buonanno (1991) realizaram estudo do músculo sóleo de ratos após secção do nervo ciático e aplicação de estimulação elétrica crônica por eletrodos implantados no músculo. Os resultados encontrados no grupo desnervado mostrou aumento de aproximadamente 40 vezes para a miogenina e 15 vezes para o myoD, sendo esses aumentos observados após 8 e 16 horas pós-desnervação, respectivamente. Com a aplicação da estimulação elétrica crônica muscular, os autores observaram brusca diminuição nos níveis dos transcritos. Os níveis de mRNA encontrados nos músculos desnervados e eletricamente estimulados foram 23% para a miogenina e 33% para o myoD, quando considerado 100% nos músculos apenas desnervados. Concluiu-se, então, que a atividade elétrica pode regular os níveis de mRNA da miogenina e myoD após desnervação.

Para saber se curtos períodos de estimulação elétrica também afetam a expressão do myoD após desnervação, foi realizada a secção do nervo isquiático e posteriormente aplicada estimulação elétrica no músculo tibial anterior de ratos. Os resultados encontrados após 28 dias de tratamento com estimulação elétrica fásica foram semelhantes aos do estudo anteriormente citado, ou seja, diminuição nos níveis de mRNA do myoD (Russo et al., 2007).

Para estudar a ação da miostatina em músculos submetidos à diferentes cargas, Wehling, Cai e Tidball (2000), realizaram experimento e avaliaram os músculos sóleo e plantar de ratos em três diferentes situações: (1) 10 dias sem carga; (2) 10 dias sem carga, seguidos de 4 dias de retorno às atividades normais, e (3) 10 dias sem carga, sendo que, durante esse período, os animais eram submetidos a exercícios 30 minutos/dia. Os resultados obtidos foram que, no grupo somente submetidos à ausência de carga houve aumento significativo (110%) do mRNA da miostatina. Quatro dias de retorno às atividades foram suficientes para que esses valores retornassem aos níveis controles, e que exercícios diários durante o período sem carga foram suficientes para não causar mudanças na expressão da miostatina. Os autores observaram que há mais mRNA e proteína da miostatina em músculos de contração rápida (plantar) do que em de contração lenta (sóleo), e maior concentração de miostatina na junção miotendínea quando comparado com o ventre muscular.

A modificação na expressão de mRNA da miostatina causada por diferentes cargas impostas ao músculo estão de acordo com a função previamente encontrada da miostatina, de ser reguladora negativa da massa muscular.

A desnervação é outra situação capaz de aumentar a quantidade de mRNA e proteína da miostatina. Zhang et al. (2005) avaliaram os níveis de mRNA e proteína da miostatina no músculo gastrocnêmio após neurotmesa do nervo isquiático e encontraram grande aumento de mRNA no estágio inicial (1 a 7 dias), com contínua elevação nesses níveis até o 28º dia e leve diminuição após 56 dias de desnervação, ainda assim, com valor maior que no grupo controle.

Para o estudo da relação da atrogina-1 com a atrofia muscular, o músculo gastrocnêmio foi analisado em quatro condições de acometimento muscular: jejum, *diabetes mellitus*, insuficiência renal e câncer, e em todas as condições observou-se diminuição do peso muscular (13-29%) e taxa de degradação protéica de 40 a 63% maior que em músculos normais. Os níveis de mRNA da atrogina-1 apresentaram-se elevados em todas as condições analisadas, mostrando a íntima relação desta proteína com a atrofia muscular (Lecker et al., 2004).

Em outro experimento, com três diferentes modelos de desuso: desnervação, imobilização e ausência de peso no membro posterior, Bodine et al. (2001), identificaram 72 genes após desnervação e imobilização, porém após ausência de peso no membro posterior tais genes não eram expressos. Entretanto, dois genes, a atrogina-1 e a *MuRF1* (*Muscle Ring Finger 1*), tiveram seus níveis elevados nos três casos. Além disso, os autores estudaram animais mutantes, nulos de atrogina-1 (*MAFbx^{-/-}*), que foram sujeitos à desnervação. Após 14 dias, esses animais apresentaram menor atrofia muscular e manutenção da área de secção transversa das fibras musculares quando comparados a animais normais.

Sabe-se que em músculos desnervados há aumento da ubiquitina conjugada à proteína e mRNA da ubiquitina (Medina, Wing e Goldberg, 1995), e que o aumento na ubiquitina conjugada à proteína após desnervação era concomitante ao aumento da proteólise (Wing, Haas e Goldberg, 1995).

Em recente estudo, Russo et al. (2007) aplicaram estimulação elétrica fásica de baixa frequência em músculo desnervado de rato e constataram diminuição da expressão da atrogina-1. Esse resultado sugere que o tratamento com estimulação elétrica, amplamente usado na fisioterapia é efetivo em minimizar a degradação de proteínas musculares em casos de desnervação. Contudo, este foi o único estudo encontrado que avaliou a aplicação da estimulação elétrica fásica por eletrodos percutâneos em músculo desnervado.

3 OBJETIVO

A expressão de alguns genes musculares, tais como o myoD, atrogina-1 e miostatina é regulada pelo impulso elétrico transmitido pelo nervo. Deste modo, a lesão do nervo periférico acarreta aumento da expressão desses genes, o que resulta em alterações musculares. Com o objetivo de fornecer estímulo ao músculo desnervado, a estimulação elétrica é um recurso utilizado pela fisioterapia, embora sejam raros os trabalhos que analisaram os efeitos deste recurso na expressão gênica e massa muscular de músculos desnervados.

Frente ao exposto, os objetivos do presente estudo foram:

- Verificar se um curto período de desnervação muscular (10 dias) provoca aumento do mRNA do myoD, miostatina e atrogina-1 e diminuição da massa muscular
- Analisar se a estimulação elétrica fásica é capaz de diminuir a expressão do myo-D, miostatina e atrogina-1 de músculos desnervados
- Analisar se a estimulação elétrica fásica é capaz de aumentar a massa muscular de músculo desnervado
- Analisar se a expressão gênica e o aumento da massa muscular são dependentes da frequência de tratamento. Para tanto, serão comparados os resultados obtidos com a estimulação elétrica aplicada diariamente e em dias alternados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 20 ratos *Wistar*, pesando 180 ± 20 g, mantidos no biotério central da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, em condições controladas de biotério com ciclo claro-escuro de 12 horas, sob temperatura de 23 ± 2 °C. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: grupo desnervação (D) (n=5): animais submetidos à lesão do nervo isquiático; grupo desnervação + eletroestimulação diária (EED) (n=5): animais submetidos à desnervação e estimulação elétrica diariamente; grupo desnervação + eletroestimulação alternada (EEA) (n=5): animais submetidos à desnervação e estimulação elétrica em dias alternados; grupo controle (C) (n=5): animais sem desnervação e sem eletroestimulação.

Para os procedimentos de desnervação, estimulação elétrica e coleta dos músculos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (50mg/mL) e cloridrato de tiazina (2g/100mL), na proporção de 1:1, em dose de 0.1 mL/100g de peso corporal. Todos os animais foram sacrificados após 12 dias do protocolo de desnervação por deslocamento cervical.

4.2 Protocolo para desnervação por esmagamento do nervo isquiático

Os animais, posicionados em decúbito ventral, foram submetidos à tricotomia da região glútea esquerda, onde foi realizada incisão de 15 mm, acompanhando o trajeto do nervo isquiático. Os planos musculares foram afastados para visualização e exposição do nervo. O esmagamento foi realizado com pinça hemostática, sendo feitos 4 pinçamentos, com duração de 20

segundos e intervalos de 1 segundo, sendo que a pressão de pinçamento foi padronizada para todos animais, utilizando-se como referência o segundo dente da pinça (Fernandes et al., 2005) (Figura 2). Após esse procedimento, os planos muscular e cutâneo foram suturados com fio de algodão 6-0 (ETHICON).

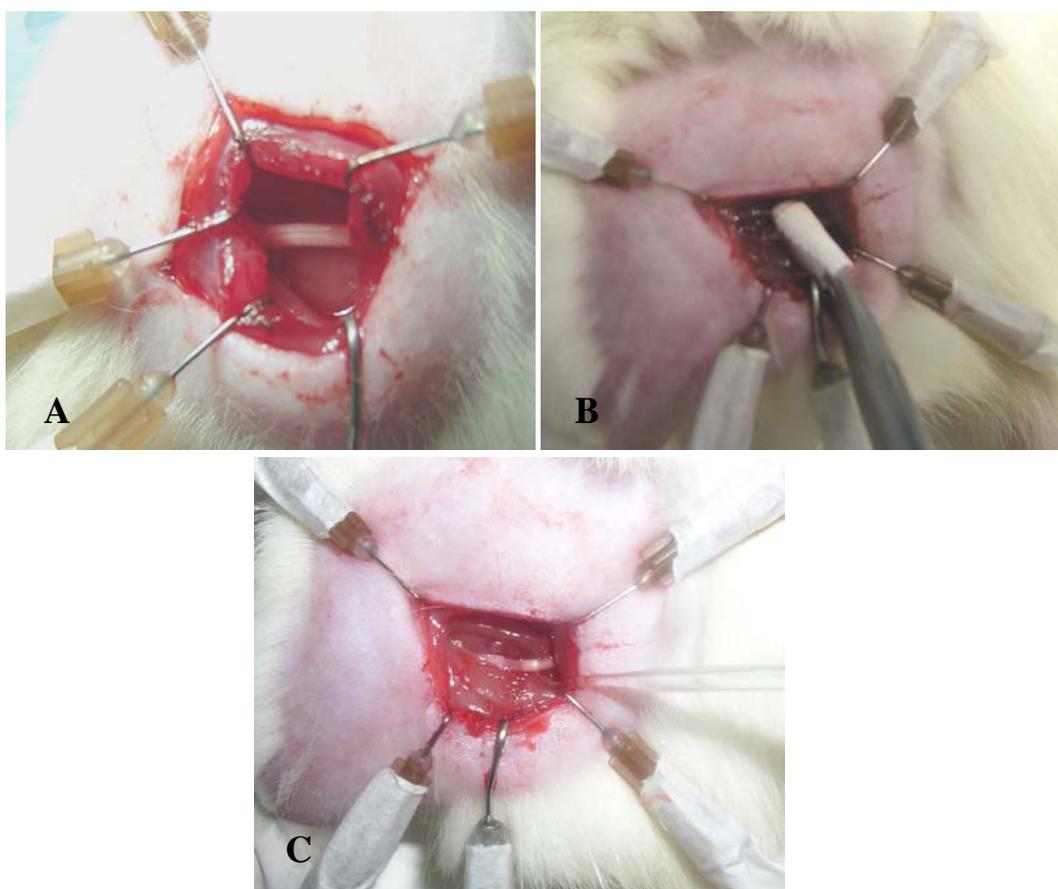


Figura 2 – Procedimento de desnervação por esmagamento do nervo isquiático de rato. A: exposição do nervo; B: esmagamento com pinça hemostática; C: visualização do nervo esmagado.

4.3 Protocolo para estimulação elétrica

Os animais foram submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio esquerdo, que teve início 24 horas após a desnervação.

A corrente elétrica foi gerada pelo equipamento DUALPEX 961 – QUARK com os seguintes parâmetros: forma de pulso quadrática bifásica simétrica, 3 ms de duração da fase, frequência de 10 Hz e intensidade inicial de 5 mA, padronizada a partir da visualização de contração vigorosa do músculo, sendo acrescida de 1 mA a cada 5 minutos para evitar acomodação da contração muscular. A duração da sessão de estimulação elétrica foi de 30 minutos. As regiões inguinal e posterior da pata esquerda de cada animal foram tricotomizadas, e 2 eletrodos percutâneos auto-adesivos, com 1 cm² de área, foram posicionados para a estimulação (Figura 3). Foi utilizado gel hidrossolúvel como agente de acoplamento e não houve estimulação elétrica aos sábados e domingos em nenhum grupo.



Figura 3 – Procedimento para estimulação elétrica do músculo gastrocnêmio de rato. Observe o posicionamento dos eletrodos na região inguinal e sobre o músculo gastrocnêmio. 1 - posicionamento do eletrodo na região inguinal; 2 – posicionamento do eletrodo sobre o músculo gastrocnêmio.

4.4 Procedimento para coleta do músculo

Após 10 dias de estimulação elétrica, o músculo gastrocnêmio esquerdo de cada animal foi retirado, pesado, a porção distal da cabeça medial do músculo foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer a -70°C .

4.5 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, a parte distal do músculo gastrocnêmio foi submetido à homogeneização com 1 mL do reagente *Trizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após homogeneização, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio às amostras, misturado por inversão e incubado por 3 min em temperatura ambiente ($15-30^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 12.000 rpm (centrífuga refrigerada 5417-R, *Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). A fase aquosa, contendo o RNA foi coletada e transferida para outro tubo autoclavado, adicionado 0,5 μL de álcool isopropílico e agitado. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 10 min visando à precipitação do RNA.

Ao final do período de precipitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 12.000 rpm. Em seguida foi realizada a lavagem do RNA precipitado com 1 mL de etanol (75%, diluído em água DEPC – *diethyl pytocarbonate* 97%). Após breve agitação, as amostras foram centrifugadas por 5 min à 7.500 rpm, o álcool foi removido (sobrenadante), o RNA foi seco ao ar livre e posteriormente foi resuspendido em 30 μL de tampão TE pH 7.6 (TRIS HCL/EDTA).

A densidade óptica das amostras foi determinada por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para avaliar

a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8).

Além disso, a qualidade do material foi também avaliada por eletroforese das amostras (25 μg de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40 mM de ácido morfolinopropanosulfônico) 1x a uma voltagem de 90mV. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA) e fotodocumentadas digitalmente utilizando câmara “Kodak Digital Science” e o software “Kodak Digital Science 1D”.

4.6 Transcrição Reversa (RT)

Após o procedimento de isolamento do RNA total, foram realizadas transcrições reversas (RT) para síntese de DNA complementar (cDNA). Para cada amostra foi utilizado 1 μg de RNA total, 1 μL de oligo dT e 9,5 μL de H₂O MilliQ autoclavada. Incubou-se por 10 min a 70°C e em seguida os tubos foram reservados em gelo para adição do *mix* contendo 4 μL de 5x Buffer, 1 μL de dNTP *mix* (Promega, Madison, WI), 2 μL de 0,1 M DTT, 0,5 μL de enzima RT (Promega, Madison, WI) e incubadas por 60 minutos a 42°C e 10 minutos a 94°C.

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida por realização de gel de agarose (1%) não denaturante, corado com brometo de etídeo.

4.7 Primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações de polimerase em cadeia, estão descritos na Tabela 1: GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), utilizado como controle interno (Gauthier et al., 1992), miostatina e atrogina-1, foram construídos utilizando-se o

software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA); myoD obtido de Hill e Goldspink (2003).

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos primers para medir a expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

Primer	Senso	Anti-senso
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA
MyoD	GGAGACATCCTCAAGCGATGC	AGCACCTGGTAAATCGGATTG
Miostatina	AGTGACGGCTCTTTGGAAGATG	AGTCAGACTCGGTAGGCATGGT
Atrogina	TACTAAGGAGCGCCATGGATACT	GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT

Os códigos de acesso no GenBank para os genes GAPDH, miostatina e atrogina-1, são AF106860, AF019624 e AF441120, respectivamente.

4.8 PCR em tempo real

Em seguida, diferentes frações das RTs foram utilizadas na amplificação em cadeia por polimerase (PCR) em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA).

A amplificação por PCR foi efetuada utilizando-se 50ng/μL de cDNA adicionado a reação contendo 25μL de SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 50-900nM dos primers (senso e anti-senso) em solução com volume final de 55 μL , dividido em dois tubos (duplicata). Na Tabela 2 estão descritas as condições da PCR em tempo real para cada um dos genes analisados.

Tabela 2 – Condições das etapas e processamento das reações de PCR para os genes analisados

Gene	Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Elongamento	Nº de ciclos
GAPDH	95°C/ 10 min	94°C/ 15 seg	56°C/ 30 seg	72°C/ 1 min	35
MyoD	95°C/ 10 min	94°C/ 15 seg	48°C/ 30 seg	72°C/ 1 min	35
Miostatina	95°C/ 10 min	94°C/ 15 seg	60°C/ 30 seg	72°C/ 1 min	35
Atrogina	95°C/ 10 min	94°C/ 15 seg	56°C/ 30 seg	72°C/ 1 min	35

Após a reação de PCR, é possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, *cycle threshold*) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica do myoD, miostatina e atrogina-1.

4.9 Análise estatística

Para testar a normalidade entre os grupos foi aplicado o teste Shapiro-Wilk. O teste de Levene foi usado para testar a homocedasticidade. Em seguida foi aplicada a análise de variância ANOVA-F (One-Way), seguido do teste de Tukey HSD. Os dados foram processados no software SPSS/PC, versão 11.0, considerando nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Massa muscular

Observou-se diminuição na massa muscular relativa em todos os grupos desnervados quando comparados ao grupo C (C: $0.287 \pm 0.030\%$ vs D: $0.159 \pm 0.012\%$; EED: $0.152 \pm 0.023\%$; EEA: $0.146 \pm 0.013\%$, $p < 0.05$). Não houve diferença entre os grupos desnervados, submetidos ou não à estimulação elétrica (Tabela 3).

Tabela 3 - Massa muscular relativa (MMR) do músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA).

Grupos	MMR (%)
C	$0.287 \pm 0,030$
D	$0.159 \pm 0,012^*$
EED	$0.152 \pm 0,023^*$
EEA	$0.146 \pm 0,013^*$

* quando comparado ao controle; $p < 0.05$

5.2 Expressão gênica da miostatina

A desnervação provocou aumento na expressão da miostatina em todos os grupos quando comparados ao C (D: 2.5-vezes, EED: 4.2-vezes e EEA: 5.6-vezes, respectivamente; $p < 0.05$). A estimulação elétrica aplicada ao músculo desnervado induziu maior expressão do gene da miostatina quando comparado ao músculo apenas desnervado (EED: 68%, e EEA: 124%, $p < 0.05$). Além disso, o grupo EEA mostrou a maior expressão do myoD nos grupos analisados (Figura 4).

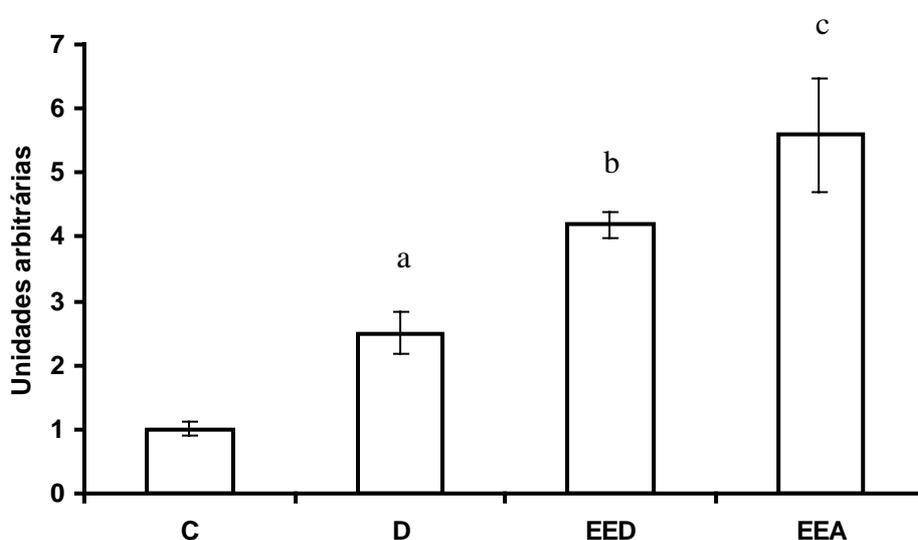


Figura 4 - Expressão de mRNA da miostatina no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA).^{a,b,c} diferença quando comparado ao C e entre os grupos ($p < 0.05$).

5.4 Expressão gênica da atrogina-1

A análise da atrogina-1 revelou padrão de aumento de mRNA após desnervação quando comparado a valores normais (D: 81-vezes, EED: 68-vezes, e EEA: 97-vezes, $p < 0.05$). A estimulação elétrica aplicada diariamente reduziu o acúmulo da atrogina-1 em 16% quando comparado ao D, e 30% quando comparado ao EEA ($p < 0.05$). Novamente, no grupo EEA foi observada o maior aumento da expressão de mRNA da atrogina-1 (Figura 5).

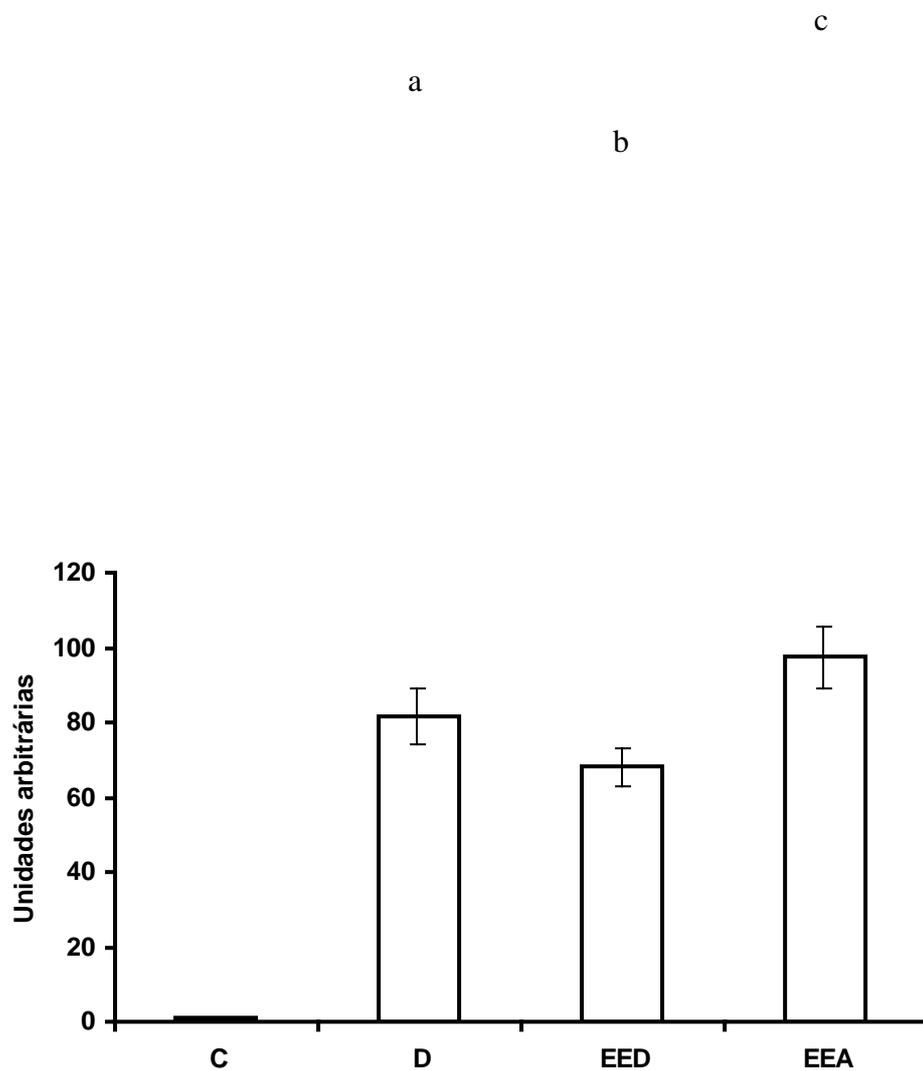


Figura 5 - Expressão de mRNA da atrogina-1 no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA).^{a,b,c} diferença quando comparado ao C e entre os grupos ($p < 0.05$).

5.5 Expressão gênica do myoD

A expressão do myoD teve um comportamento similar em sua expressão quando comparado à miostatina. Todos os grupos desnervados apresentaram um aumento na expressão do myoD quando comparados a valores normais (D: 18-vezes, EED: 23-vezes, e EEA: 27-vezes, $p < 0.05$). A estimulação elétrica também causou taxas superiores na expressão da miostatina se comparados com o grupo apenas desnervado (EED: aumento de 21.3%, EEA: aumento de 33.2%, $p < 0.05$) (Figura 6).

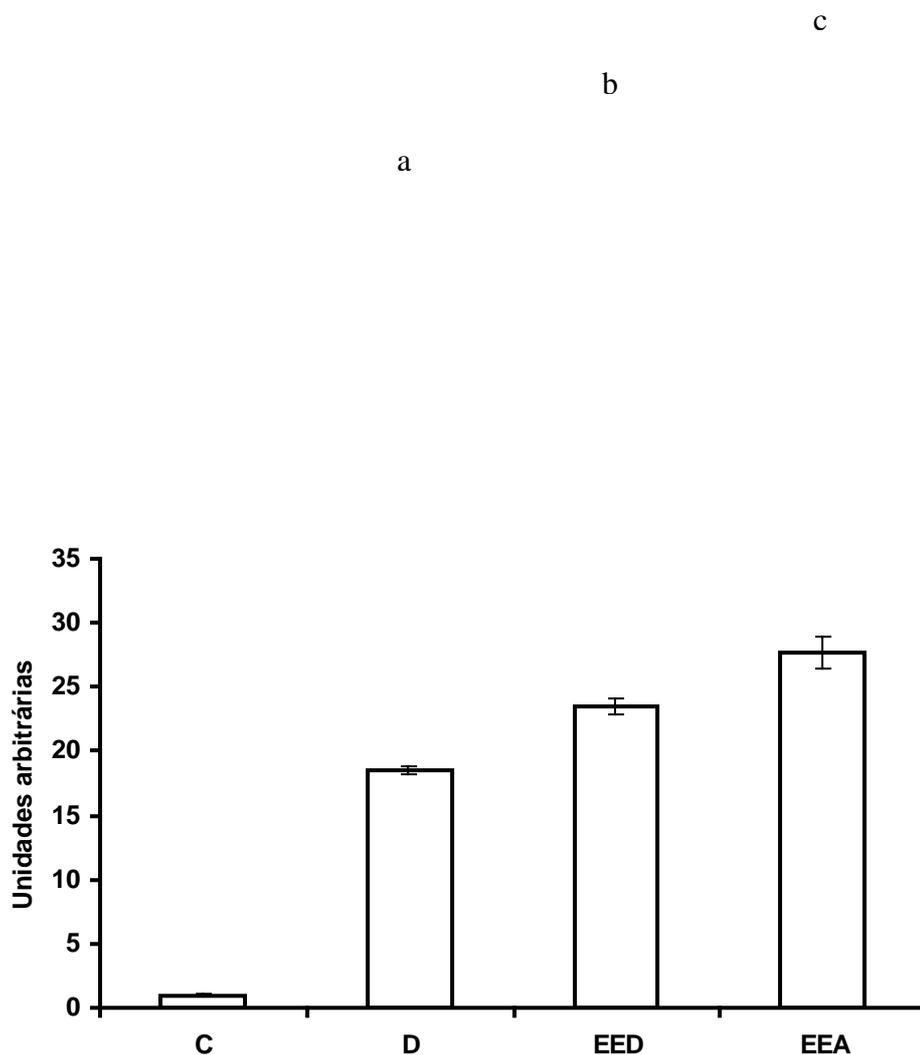


Figura 6 - Expressão de mRNA do myoD no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos controle (C), desnervado (D), desnervado e eletroestimulado diariamente (EED) e desnervado e eletroestimulado alternadamente (EEA).^{a,b,c} diferença quando comparado ao C e entre os grupos ($p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da estimulação elétrica fásica na massa muscular e na expressão gênica do myoD, miostatina, e

atrofina-1 do músculo gastrocnêmio de rato desnervado por esmagamento. O protocolo de estimulação elétrica utilizado permitiu verificar se este recurso de tratamento, bem como sua frequência de aplicação, é capaz de alterar o comportamento de certos genes musculares.

Dentre os animais usados em pesquisa básica, o rato é o mais utilizado para o estudo das lesões nervosas periféricas, pois a estrutura de seu nervo é semelhante ao dos humanos, com exceção de algumas particularidades (Mackinnon; Dellon; Hunter, 1985; 2).

A desnervação é um modelo de desuso utilizado para melhor entender os efeitos que a falta de atividade elétrica acarreta no músculo esquelético. A axoniotmese causa degeneração nervosa total desde o local da lesão até a parte distal do nervo e permite entender o comprometimento muscular decorrente de esmagamento e estiramento nervoso, comumente encontrados na clínica. Além disso, Bridge et al. (1994), comprovaram que a compressão do nervo isquiático em ratos é um modelo confiável de axoniotmese.

No presente estudo, a massa muscular diminuiu em torno de 47% nos grupos desnervados, independentes de terem sido tratados (Tabela 3). Este resultado foi semelhante ao encontrado por Polacow et al. (2003), que observaram 49% de diminuição da massa muscular nos grupos desnervados, independente de receberem estimulação elétrica, quando comparado ao controle. Zhang et al. (2005), analisaram o músculo gastrocnêmio de ratos pós neurotmese do nervo isquiático em vários períodos e verificaram redução de 50, 65 e 80% da massa muscular após 14, 28 e 56 dias, respectivamente, quando comparados ao controle. A diminuição da massa muscular no músculo desnervado pode ter

relação com o aumento da expressão de dois genes aqui analisados, a miostatina e a atrogina-1.

A miostatina é conhecida como reguladora negativa de massa muscular, podendo agir no controle tanto do número quanto do tamanho da fibra muscular (McPherron, Lawler e Lee, 1997), e sua expressão é aumentada em situações de desuso (Zhang et al., 2005; Wehling, Cai e Tidball, 2000).

Os resultados do presente estudo mostraram aumento de 2.5 vezes (150%) nos transcritos da miostatina no músculo gastrocnêmio após 10 dias de desnervação (Figura 4), sendo os mesmos condizentes com estudo de Zhang et al. (2005), que relatam aumento tanto do mRNA quanto da proteína miostatina no músculo gastrocnêmio de rato analisado após 14 dias de lesão do nervo isquiático. Do mesmo modo, Baumann et al. (2003) também analisaram o músculo gastrocnêmio de ratos e já no primeiro dia de desnervação encontraram 31% de aumento da expressão da miostatina.

Embora os resultados encontrados no grupo D estejam de acordo com estudos prévios, os resultados dos animais que receberam tratamento com estimulação elétrica não foram os esperados. Os animais dos grupos EED e EEA apresentaram, respectivamente, valores 1.7 e 2.4 vezes maiores que do grupo D (Figura 4), sendo esses dados conflitantes, uma vez que a estimulação elétrica aumenta a demanda muscular, sendo, portanto esperado diminuição da expressão da miostatina.

No entanto, resultados similares também foram encontrados por Peters et al. (2003) e Willoughby (2004), que estudaram a expressão da miostatina após a realização de exercícios. Esses autores relatam resultados inesperados e interessantes, uma vez que os níveis desta proteína encontraram-se maiores

após aumento da demanda muscular. Peters et al. (2003) submeteram ratos adultos à exercício excêntrico e observaram que os níveis de mRNA da miostatina aumentaram muito rápido (30 min) após término do exercícios nos músculos tibial anterior e EDL, mantendo pico até 12 h e retornando aos níveis normais 24 h após a execução do exercício. Em um estudo realizado com humanos, Willoughby (2004) verificou aumento de mRNA da miostatina após 12 semanas de treino de resistência em voluntários do sexo masculino. O autor também constatou que a expressão da FLRG (*follistatin like gene related*) estava aumentada, sugerindo que a miostatina pode ter sido inibida pela ação da FLRG, uma vez que esta é conhecida por ligar-se, inibir e regular negativamente a miostatina (Hill et al., 2002).

Uma possível hipótese para o maior aumento da miostatina nos grupos eletroestimulados estaria relacionada com o estresse provocado pela eletroestimulação. Sabe-se que a expressão da miostatina é regulada pelo hormônio glicocorticóide (Ma et al., 2003), assim, os níveis hormonais desses animais poderiam estar elevados em decorrência da estimulação elétrica. No entanto, não foi realizada a dosagem deste hormônio, sendo que esta hipótese não pôde ser confirmada.

Vale ainda destacar que a avaliação realizada neste estudo foi de mRNA, e que estes valores não representam precisamente os níveis de proteína funcional, já que a miostatina sofre alterações pós-transcricional (Langley et al., 2002; McMahon et al, 2003).

Outro estudo interessante relacionada à miostatina foi realizado em 2003, onde McMahon et al. realizaram estudo com ratos mutantes (-/-) e observaram que a diminuição da massa corporal e muscular resultante da

suspensão do membro posterior foi mais evidente nesses animais que em animais adultos normais. Esses dados foram contraditórios à hipótese de que a miostatina regula negativamente a massa muscular, e mostram que em animais adultos a ausência de miostatina não atenuou a perda da massa corporal e muscular durante a suspensão do membro. Pelo contrário, tais resultados sugeriram que animais ausentes de miostatina são mais susceptíveis que os normais à atrofia muscular induzida por suspensão do membro.

Com base no exposto, pode-se concluir que, embora o efeito da miostatina esteja bem definido durante a fase embriônica e no desenvolvimento pós-natal (McPherron, Lawler e Lee, 1997), o seu papel no músculo adulto ainda é controverso e de difícil interpretação.

A atrogina-1 é uma proteína músculo-específica atuante no processo de degradação protéica. Em condições normais ela não é expressa no músculo, e sua presença caracteriza quadro de atrofia muscular (Lecker, et al., 1999). Vários modelos experimentais que causam atrofia muscular, tais como doenças metabólicas (Lecker et al., 2004), jejum (Wing, Haas e Goldberg, 1995), imobilização (Taillandier et al., 1996; Bodine, 2001) e ausência de peso (Bodine, 2001) foram utilizados para o estudo da expressão da atrogina. A presença da atrogina-1 em todas essas situações deixou clara a forte relação desta proteína com a atrofia muscular, independente da causa da mesma.

Dentre os modelos de desuso, a desnervação também foi utilizada e os níveis da atrogina-1 também se mostraram elevados nesse caso. Wing, Haas e Goldberg (1995) analisaram se a atrofia do músculo sóleo, causada por desnervação, era associada à via de degradação protéica ubiquitina-proteossomo. Observou-se que os níveis de ubiquitina conjugada a proteínas

aumentaram significativamente no sóleo. Tal análise foi realizada após 2 dias de intervenção, mostrando que essa via é rapidamente ativada em resposta à estímulos de desuso.

Bodine et al. (2001), identificaram o aumento da expressão da atrogina-1 após 3 dias em músculos submetidos à desnervação. Além disso, realizaram experimento com animais mutantes, ausentes de atrogina-1, e observaram que esses animais, mesmo quando desnervados, não apresentavam atrofia muscular, o que comprovou o importante papel dessa proteína no processo da atrofia.

Os resultados aqui encontrados são condizentes com os citados anteriormente. O aumento do mRNA da atrogina-1 observado no grupo D foi de 81 vezes. Por outro lado, o grupo EED apresentou níveis de atrogina-1 16% menor que no grupo D, sugerindo que o tratamento diário com estimulação elétrica foi benéfico, pois a redução dos níveis de atrogina-1 sugere minimização da degradação protéica pela via ubiquitina-proteossomo. Por outro lado, o acúmulo de mRNA da atrogina-1 no grupo EEA foi ainda maior que no D, mostrando que a quantidade de estímulo influencia na transcrição da atrogina-1, sendo que a estimulação elétrica aplicada em dias alternados causou aumento na transcrição desse gene (Figura 5). Os mecanismos envolvidos neste achado não estão esclarecidos, sendo necessários mais estudos para o entendimento da regulação desse gene.

Contrário aos resultados encontrados, Russo et al. (2007) verificaram que os níveis de mRNA da atrogina-1 reduziram significativamente no músculo tibial anterior desnervado de ratos e submetidos à eletroestimulação (fásica, 20 contrações/sessão a cada 48 h, realizada durante 28 dias). Vale destacar que os

parâmetros da corrente utilizada, assim como o músculo analisado, foram diferentes aos utilizados neste estudo e ainda que este foi o único trabalho encontrado que analisou a expressão gênica da atrogina-1 após desnervação e aplicação de estimulação elétrica.

No estudo aqui realizado, apesar da redução da expressão da atrogina-1 no grupo EED sugerir menor atrofia, não foi observada diferença na massa muscular relativa nesse grupo quando comparado aos demais grupos desnervados. Uma possível hipótese para este resultado é que embora o período de 10 dias seja suficiente para causar alterações na transcrição deste gene, a alteração na massa do músculo ocorra em período mais longo.

Outro gene analisado foi o do myoD, relacionado com a miogênese e ativação de células satélites (Tapscott, 2005). A expressão desse gene é normalmente aumentada frente à desnervação, indicando que a atividade elétrica tem efeito regulatório no músculo (Eftimie, Brenner e Buonanno et al., 1991; Ishido, Kami e Masuhara, 2004; Russo et al., 2007). Além disso, Ishido, Kami e Masuhara (2004) sugerem que o aumento do myoD após lesão nervosa está relacionada à prevenção da atrofia muscular causada pela desnervação.

No presente estudo foi observado que no grupo que sofreu desnervação os níveis dos transcritos do myoD aumentaram 18 vezes (Figura 6), dados que estão de acordo com os estudos previamente mencionados.

Nos grupos EED e EEA este aumento foi ainda maior, 23 e 27 vezes, respectivamente, sugerindo que a aplicação de estimulação elétrica fásica nos parâmetros aqui empregados aumentou ainda mais a ativação de células satélites no músculo desnervado. Como ocorrido com a miostatina e atrogina-1, a estimulação elétrica aplicada em dias alternados provocou maior aumento na

transcrição do myoD do que quando aplicada diariamente. O estímulo gerado no grupo EEA foi 40% menor que no EED, no entanto foi capaz de provocar aumento ainda maior na expressão dos três genes analisados.

Estudos que avaliaram a expressão do myoD em músculos desnervados e eletroestimulados mostram resultados bastante variados, entretanto, a comparação desses resultados é difícil, pois os métodos e técnicas utilizadas foram diferentes entre eles. Eftimie, Brenner e Buonanno et al. (1991), mostraram que a aplicação de estimulação elétrica crônica (24h) por eletrodos implantados no músculo sóleo desnervado de rato reduziu significativamente os níveis de mRNA do myoD após 6 e 10 dias quando comparado com animais apenas desnervados.

No trabalho de Vissing et al. (2005), a estimulação elétrica foi aplicada por eletrodos de superfície no músculo tibial anterior de homens paraplégicos. Os autores avaliaram a expressão gênica do myoD após 2 e 4 semanas. A estimulação começou com duração de 2h/dia e ao fim do estudo o período estimulado era de 6h/dia. Não foram relatadas mudanças após 2 semanas, contudo ao final da 4ª semana observaram aumento nos níveis dos transcritos, sugerindo que o myoD é positivamente regulada em resposta a estimulação elétrica de músculos paralisados.

No estudo de Russo et al. (2007), a aplicação da corrente elétrica foi realizada por curto período (20 contrações/sessão) no músculo tibial anterior de ratos após desnervação. Contudo, diferente dos resultados aqui encontrados, foi observado diminuição dos níveis de transcrição do myoD no grupo que foi tratado com estimulação elétrica quando comparado com o grupo desnervado. Vale destacar que apesar dos autores terem realizado a estimulação elétrica fásica

com eletrodos de superfície, como aqui utilizado, o tipo de desnervação, os parâmetros da corrente elétrica, o músculo analisado e o tempo de análise foram diferentes, o que possivelmente explica a divergência nos resultados.

Em 2003, Peters et al. estudaram o comportamento da expressão do myoD após realização de exercício excêntrico no membro posterior de ratos adultos normais. Os resultados mostraram aumento desse gene 3h após, atingindo seu pico após 6h e retornando aos níveis basais 120h após a série de exercícios. Apesar de ter sido analisado músculo normal, esses resultados, assim como os encontrados no presente trabalho, mostram aumento da transcrição do myoD após ativação muscular.

Um resultado não esperado aqui encontrado foi o aumento concomitante nos transcritos da miostatina e do myoD, já que estudos prévios relatam papel inibitório da miostatina sobre os fatores regulatórios miogênicos (MRFs) (McPherron, Lawler e Lee, 1997; Langley et al., 2002). Vale salientar que tais estudos foram realizados *in vitro* e/ou em embriões, o que difere do aqui realizado, que avaliou músculo adulto. Os achados de Peters et al. (2003), após realização de exercício excêntrico em ratos, mostraram resultados semelhantes ao do presente estudo, isto é, a miostatina não inibiu a expressão do myoD, levantando a hipótese que a regulação entre a miostatina e myoD no músculo adulto pode não ser semelhante à do período embrionário.

Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que os mecanismos envolvidos na regulação da expressão do myoD, miostatina e atrogina-1 em músculos adultos não estão totalmente esclarecidos, sendo necessários mais estudos para o entendimento dos resultados obtidos.

7 CONCLUSÃO

- Curto período de desnervação promove aumento dos genes do myoD, miostatina e atrogina-1, e diminuição da massa muscular, mostrando a importância da atividade neural para a preservação da característica muscular normal.
- Diferente dos resultados esperados, a estimulação elétrica fásica, de modo geral, aumentou a transcrição dos genes do myoD, miostatina e atrogina-1 e não influenciou na massa muscular de músculo desnervado. Esses resultados podem ser dependentes dos parâmetros de estimulação elétrica utilizados, uma vez que estudos prévios apresentaram diminuição da expressão dos genes analisados.
- Uma vez que a aplicação de estimulação elétrica em dias alternados resultou em maior nível de expressão dos genes da miostatina, myoD e atrogina-1 quando comparada com a estimulação aplicada diariamente, conclui-se que a frequência de tratamento imposta ao músculo influencia na transcrição de genes específicos do músculo.
- O tratamento diário mostrou ser um protocolo mais efetivo do que o tratamento em dias alternados, uma vez que o mesmo diminuiu a expressão da atrogina-1, gene relacionado com a instalação da atrofia muscular.

REFERÊNCIAS*

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª edição. Editora Artmed, 1997.

Arnold HH, Braun T. Genetics of muscle determination and development. *Curr Topics Develop Biol*. 2000; 48: 129-64.

Auclair D, Garrel DR, Zerouala AC, Ferland LH. Activation of the ubiquitin pathway in rat muscle by catabolic doses of glucocorticoids. *Am J Physiol*. 1997; 272: C1007-C1016.

Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DHR, Goldberg AL. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol*. 1995; 268: E996-E1006.

Berkes CA, Tapscott, SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16: 585-95.

Bickel CS, Slade J, Mahoney E, Haddad F, Dudley GA, Adams GR. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol*. 2004; 98: 482-88.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001; 294: 1704-08.

Braun T, Bushhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T ½ fibroblasts. *Eur Molec Biol Org J*. 1989; 8: 701-09.

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, Hertl C. Nerve crush injuries – a model for axonotmesis. *Exp Neurol* 1994; 27: 284-90.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carlsen H, Gundersen K. Helix-loop-helix transcription factors in electrical active and inactive skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2000; 23: 1374-80.

Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84(1): 209-38.

Cooper, MC. A célula: uma abordagem molecular. 2ª edição Ed Artmed, 2002.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987; 51:987-1000.

Deshaies RJ. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15: 435-67.

Dominique JE, Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*. 2006; 312:2401-14.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG, Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscles of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. *Restor Neurol Neurosci*. 2006; 24(1): 41-54.

Eberstein A, Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? *Med Sci Sports Exerc*. 1996; 28(12): 1463-9.

Edmonson DG, Olson EN. A gene with homology to the myc similarity region of myoD is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Develop*. 1989; 3: 628-40.

Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 1349-53.

Fernandes KC, Fuentes CB, Campos GE, Somazz MC, Polacow ML, Guirro RR, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot*. 2005; 9(2): 235-241.

Gauthier JM, Theriault R, Theriault G, Geliman Y, Simoneau JA. Electrical stimulation induced changes in skeletal muscle enzymes of men and women. *Med Sci Sports Exerc.* 1992; 24(11): 1252-6.

Girgenrath S, Song Kening, Whittemore L. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle nerve.* 2005; 31: 34-40.

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Molec Med.* 2003; 9(8): 344-50.

Goldspink G. Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(2): 285-90.

Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin, S. Role of myostatin in metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004; 7: 451-7.

Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem.* 2002; 277(43): 40735-41.

Hill M, Goldspink G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 2003; 549(Pt 2): 409-18.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNA in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development.* 1993; 118: 1137-47.

Hyatt JPK, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton R. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells myonuclei. *Am J Physiol.* 2003; 285: 1161-73.

Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression of myoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287:484-93.

Kraus B, Pete D. Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles - Effects of Hypothyroidism and Chronic Low-Frequency Stimulation. *Eur J Biochem.* 1997; 247: 98-106.

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin Inhibits myoblast differentiation by down-regulating myoD expression. *J Biol Chem.* 2002, 277(51): 49831-40.

Lecker SH, Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6(3): 271-5.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004; 18:39-51.

Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg, AL. Muscle breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J. Nutr.* 1999; 129(Suppl):227S-237S.

Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:61-86.

Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *u PNAS.* 2001; 98(16): 9306-9311.

Lieber RL. *Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation.* 2 ed. Baltimore-USA, Williams & Wilkins, 2002.

Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Marzabal M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumor-bearing rats. *FEBS Lett.* 1994, 338: 311-18.

Loughna PT, Brownson C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. *FEBS Lett.* 1996; 390: 304-06.

Ludolph DC, Konieczny SF. Transcriptions factors families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J.* 1995; 9: 1595-1604.

Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, et al. Glucocorticoids-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: 363-71.

Mackinnon SE, Dellon AL, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1985; 75: 384-88.

Matsakas A, Diel P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. *Int J Sports Med.* 2005; 26: 83-89.

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol.* 2003; 162(6): 1135-47.

McHanon CD, Popovic L, Oldham JM, Jeanplong F, Smith HK, Kambadur R, et al. Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: E82–E87.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature.* 1997; 387:83-90.

Medina R, Wing S, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J.* 307: 631-37.

Peters D, Barash IA, Burdi M, Yuan PS, Mathew L, Fridén J, et al. Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. *J Physiol.* 2003; 553(3): 947-57.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfológico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisiot* 2003; 7(1): 77-84.

Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkowitz C, England BK, Ding X, et al. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1703-08.

Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2005; 288: 1423-31.

Rhodes S, Konieczny SF. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Develop*. 1989; 3: 2050-61.

Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282: C993-C999.

Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2007; 35:87-97.

Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Kei S, Totsuka T. The adaptive response of MyoD family proteins in overloaded, regenerating and denervating muscles. *Bioch Biophys Acta*. 1999; 1428: 284-92.

Salonen V, Lehto M, Kalimo H, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve*. 1985; 8: 125-31.

Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994;123:213-57.

Taillander D, Aourousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, et al. Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J*. 1996; 316: 65-72.

Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development*. 2005; 132(12): 2685-95.

Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*. 2000; 275 (51): 40235-43.

Vissing K, Andersen JL, Harridge SDR, Sandri C, Hartkopp A, Kjaer M, Schjerling P. Gene expression of myogenic factors and phenotype-specific markers in electrically stimulated muscle of paraplegics. *J Appl Physiol* 2005; 99: 164-72.

Voytik SL, Przyborski M, Badlak SF, Konieczny SF. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn*. 1993; 198: 214-24.

Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil*. 2000; 21: 647-53.

Wehling M, Cai B, Tidball JG. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* 2000; 14: 103-10.

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer S, Krause M, Benezra R, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 1991; 251: 761-66.

Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36(4):574-82.

Wing SS, Haas AL, Goldberg AL. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J*. 1995; 307:639-45.

Witzemann V, Sakmann B. Differential regulation of MyoD and myogenin mRNA levels by nerve induced muscle activity. *FEBS* 1991; 282(2): 259-64.

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to myoD. *Cell*. 1989; 56: 607-17.

Zhang D, Liu M, Ding F, Gu X. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil*. 2005; 27(1): 37-44.

