

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA
MESTRADO ACADÊMICO

**EFEITO DE DOZE SEMANAS DE TREINAMENTO RESISTIDO COM
SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEINS E DECANOATO DE NANDROLONA,
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1 E MAFBX EM RATOS
WISTAR**

ROGER MEDEIROS XAVIER

ORIENTADOR: Dr. FRANCISCO NAVARRO

SÃO LUIS

2019

ROGER MEDEIROS XAVIER

**EFEITO DE DOZE SEMANAS DE TREINAMENTO RESISTIDO COM
SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEINS E DECANOATO DE NANDROLONA,
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1 E MAFBX EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Maranhão, para qualificação para a obtenção do Título de Mestre em Educação Física.

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento Humano.

Linha de Pesquisa: Atividade Física Aplicada às Doenças Crônicas Não Transmissíveis.

Orientador: Dr. Francisco Navarro.

SÃO LUÍS

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Xavier, Roger.

EFEITO DE DOZE SEMANAS DE TREINAMENTO RESISTIDO COM SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEINS E DECANOATO DE NANDROLONA, SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1 E MAFBX EM RATOS WISTAR / Roger Xavier. - 2019.

66 f.

Orientador(a): Francisco Navarro.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Educação Física/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Nandrolona. 2. Treinamento Resistido. 3. Whey Proteins. I. Navarro, Francisco. II. Título.

ROGER MEDEIROS XAVIER

**EFEITO DE DOZE SEMANAS DE TREINAMENTO RESISTIDO
COM SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEINS E DECANOATO
DE NANDROLONA, SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR,
MURF-1 E MAFBX EM RATOS WISTAR**

Dissertação para defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Educação Física.

A Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Francisco Navarro (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Ana Eugenia R. de Araujo F. Almeida (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Antonio Coppi Navarro (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Herikson Araujo Costa (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

São Luís
2019

DEDICATORIA

A minha mãe Enilde Lima Medeiros, aos meus irmãos Roberts Medeiros Xavier, Bruney Pablo Oliveira de Melo, Danilo Ericeira de Lacerda, Carlos Henrique Farias Barros, Hilton Jovita de Sousa Filho, Ronan Brito dos Santos, aos meus orientadores Francisco Navarro e Antonio Coppi Navarro, todas essas pessoas são aquelas que me estenderam a mão, por último a toda minha família que me apoiou com muita ajuda e esforço para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.”

AGRADECIMENTOS

A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Educação Física pela oportunidade e empenho para nos oferecer a melhor formação, especialmente ao coordenador Prof. Dr. Christiano Eduardo Veneroso pela toda sua dedicação e ajuda.

Ao Vice-coordenador Prof. Dr. Cristiano Teixeira Mostarda pela sua dedicação e disponibilidade sempre que possível.

Aos professores do Mestrado que contribuíram na formação e instrução Prof. Dr. Antonio Coppi Navarro, Prof. Dr. Christian Emmanuel Torres Cabido, Prof. Dr. Emanuel Pericles Salvador, Prof. Dr. Emerson Silami Garcia, Prof. Dr. Nelo Eidy Zanchi, Prof. Dr. Almir Vieira Dibai Filho, Prof. Dr. Christiano Bertoldo Urtado e Mario Norberto Sevilio de Oliveira Junior.

A Universidade Federal do Maranhão que me ofereceu a oportunidade de instrução e formação.

Ao laboratório LAFIPEMA que me ofereceu a oportunidade de instrução e formação.

Ao Prof. Dr. Francisco Navarro, pelos seus sermões quando precisei, orientação, seu grande desprendimento em ajudar a mim e todos seus orientandos e a sua amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Antônio Coppi, e sua paciência em ajudar, aconselhar, ensinar e corrigir, tornando assim mais fácil nossa caminhada acadêmica.

Aos meus irmãos e amigos Roberts Medeiros Xavier, Bruney Pablo Oliveira de Melo, Danilo Ericeira de Lacerda, Carlos Henrique Farias Barros, Hilton Jovita de Sousa Filho, Ronan Brito dos Santos, Diego Antonio de Jesus Macau e Milena Silva de Oliveira, aqueles que sempre me ajudaram e apoiaram quando precisei.

Aos companheiros de laboratório Diego Antonio de Jesus Macau, Bruno Luiz Galvão de Miranda, Anne Karynne da Silva Barbosa, Sérgio Luís do Nascimento Junior, Milena Silva de Oliveira, Júlio César da Costa Machado, Raphael Marques, Alanna Josélia Santiago Silva e Elaine Paiva Vieira, que ajudaram e fizeram parte dessa caminhada.

A minha mãe Enilde Lima Medeiros, a pessoa mais brilhante, amorosa e companheira, a parte de Deus que está comigo.

RESUMO

Objetivo: Verificar o efeito de 12 semanas de treinamento resistido, com suplementação de Whey Proteins e aplicação de Decanoato de Nandrolona na expressão gênica em vias de síntese MTOR e degradação proteica MURF-1 e MAFBX da porção branca do músculo gastrocnêmio de ratos machos Wistar.

Materiais e Métodos: Foi realizado com 97 ratos machos da linhagem Wistar com idade inicial de 60 dias e massa corporal de 200g a 350g, distribuídos aleatoriamente em 11 grupos. O protocolo teve duração de 12 semanas com treinamento resistido em três vezes por semana, suplementação diária, e aplicação de Decanoato de Nandrolona. Foi avaliado a expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBx na porção branca do músculo gastrocnêmio através do método Polimerase chain Reaction real time (PCR-RT), análise histológica, além da força muscular a cada duas semanas. A análise estatística consistirá em descritiva e analítica (Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), Anova ($p < 0,05$) e Pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados: MTOR foi superior e significativa no grupo Treinamento Resistido Controle (TC) em relação aos grupos suplementados com Whey Proteins W2 ($p = 0,0176$), W4 ($p = 0,0329$) e W6 ($p = 0,0437$) e na expressão gênica de MURF-1 o grupo Controle (C) apresentou diferença significativa em relação ao grupo W4 ($p = 0,0319$) e W6 ($p = 0,0160$), na expressão do gene MAFBX não houve diferença significativa nos grupos. **Discussão:** A expressão de MTOR foi significativa no grupo Treinamento Resistido Controle (TC) em relação aos suplementados sedentários W2 ($p = 0,0176$), W4 ($p = 0,0329$) e W6 ($p = 0,0437$), juntamente com a expressão de MURF-1 que apresenta diferença do grupo controle (C) em relação aos suplementados W4 ($p = 0,0319$) e W6 ($p = 0,0160$), apesar do resultado parcialmente positivo, outros grupos com maiores quantidades de intervenções não apresentavam diferença significativa. **Conclusão:** Novas doses a partida da terapêutica ou acima dela devem ser realizadas em estudo futuros, para verificar influencias a expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX.

Palavras-chave: Treinamento Resistido. Whey Proteins. Nandrolona. MTOR. MURF-1. MAFBX.

ABSTRACT

Aim: To verify the effect of 12 weeks of resistance training with Whey Proteins supplementation and Nandrolone Decanoate application for gene expression in MTOR pathways and MURF-1 and MAFBX protein degradation of the Wistar male gastrocnemius muscle. **Materials and Methods:** Was performed with 97 male Wistar rats with initial age of 60 days and body mass of 200g to 350g, randomly distributed in 11 groups. The protocol lasted 12 weeks with resistance training three times a week, daily supplementation, and application of Nandrolone Decanoate. The gene expression of MTOR, MURF-1 and MAFBx in the white portion of the gastrocnemius muscle was evaluated by the real time polymerase chain reaction (PCR-RT) method, histological analysis, and muscle strength every two weeks. Statistical analysis will consist of descriptive and analytical (Shapiro-Wilk ($p > 0.05$), Anova ($p < 0.05$) and Tukey Posttest ($p < 0.05$). **Results:** MTOR was higher and significant in the Resistance Control Training (TC) group compared to the Whey Proteins W2 ($p = 0,0176$), W4 ($p = 0,0329$) and W6 ($p = 0,0437$) and W6 supplemented groups. In the MURF-1 gene expression, the Control group (C) showed a significant difference in relation to the W4 ($p = 0,0319$) and W6 ($p = 0,0160$) groups. In the MAFBX gene expression there was no significant difference in the groups. **Discussion:** MTOR expression was significant in the Resistance Control Training (TC) group compared to sedentary supplements W2 ($p = 0,0176$), W4 ($p = 0,0329$) and W6 ($p = 0,0437$), along with MURF-1 expression that shows a difference in the control group (C) compared to the supplemented W4 ($p = 0,0319$) and W6 ($p = 0.0160$), despite the partially positive result, other groups with larger amounts of interventions showed no significant difference. **Conclusion:** The dose (0.5 mg / kg) does not to be sufficient to influence a gene expression of MTOR, MURF-1 and MAFBX.

Key words: Resistance Training. Whey Proteins. Nandrolone. MTOR. MURF-1. MAFBX.

LISTA QUADRO

Número	Título do Quadro	Página
1	Composição Nutricional da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Proteins.	31
2	Aminograma da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Proteins.	31

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Número	Título de Ilustração	Página
1	Cálculo do tamanho do efeito e tamanho amostral no programa G Power.	26
2	Escada para realização de treinamento resistido.	33
3	Mensuração de área celular do musculo gastrocnêmio.	41
4	Massa corporal total inicial de todos os grupos.	45
5	Delta da massa corporal total final de todos os grupos.	46
6	Variação do Peso Máximo Carregado de todos os grupos durante 12 semanas	49
7	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TC	50
8	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW2	50
9	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW4	51
10	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW6	51
11	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TCD	52
12	Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TWD2	52
13	Representação gráfica do peso da massa total do musculo gastrocnêmio relativo a cada 100g do animal.	53
14	Representação gráfica do diâmetro histológico do musculo gastrocnêmio esquerdo	54

15	Representação gráfica expressão gênica de MTOR do musculo gastrocnêmio direito.	55
16	Representação gráfica expressão gênica de MURF-1 do musculo gastrocnêmio direito.	56
17	Representação gráfica expressão gênica de MAFBX do musculo gastrocnêmio direito.	56

LISTA DE TABELA

Número	Título da Tabela	Página
1	Massa Corporal Total (MCT), Relativa em média, Erro padrão e Percentual	44
2	Consumo absoluto de whey proteins (g. semana-1) em média e erro padrão	47
3	Variação do Peso Máximo Carregado (g) em média e erro padrão conforme o reajuste a cada duas semanas do treinamento resistido.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA	14
2	OBJETIVO	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	HIPÓTESES	19
3.1	HIPÓTESE H₀	19
3.2	HIPÓTESE H₁	19
4	REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1	SUPLEMENTAÇÃO E TREINAMENTO	20
4.2	DECANOATO DE NANDROLONA	21
4.3	DECANOATO DE NANDROLONA E TREINAMENTO	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	POPULAÇÃO E AMOSTRA	26
5.1.1	Cálculo amostral	26
5.1.2	Amostra	27
5.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	28
5.2.1	Inclusão	28
5.2.2	Exclusão	29
5.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
5.4.1	Controle da massa corporal	29
5.4.2	Suplementação/ gavagem	29
5.4.3	Controle do consumo de Ração	32

5.4.4	Treinamento resistido	32
5.4.4.1	Protocolo de adaptação ao treinamento	32
5.4.4.2	Teste de carga máxima (TCM)	33
5.4.4.3	Protocolo de treinamento resistido	34
5.4.5	Aplicação de Decanoato de Nandrolona	34
5.4.6	Eutanásia	35
5.4.7	Extração do Músculo e Armazenamento	35
5.4.8	Expressão Gênica de MTOR, MURF-1, MAFBX	36
5.4.8.1	Extração de RNA	36
5.4.8.2	Transcriptase reversa	38
5.4.8.3	Reação de cadeia de polimerase (Power Syber Green)	39
5.4.8.4	Análise quantitativa da transcrição reversa por PCR tempo real	39
5.4.9	Análises Histológicas	40
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6	RESULTADOS	43
6.1	MASSA CORPORAL TOTAL E RELATIVA	44
6.2	CONSUMO DE WHEY PROTEINS	47
6.3	TESTE DE PESO MÁXIMO CARREGADO (PMC)	48
6.4	PESO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO ESQUERDO RELATIVO À 100G DO ANIMAL	53
6.5	DIÂMETRO HISTOLÓGICO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DIREITO	54
6.6	EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1 E MAFBX DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DIREITO	55
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÃO	60
	REFERENCIAS	61
	APÊNDICE	65
	ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Os músculos esqueléticos constituem a maior parte da musculatura corporal e equivalem a cerca de 40% do peso corporal total, são responsáveis pelo posicionamento e o movimento do esqueleto, geração de força, homeostase, metabolismo energético, reserva de aminoácidos, função imune e aumento de secção transversa muscular (Silverthorn, 2017; Macintosh, Gardiner e Mccomas, 2006).

Nesse sentido, ter uma integridade muscular esquelética, e mantê-la, são importantes determinantes de saúde do corpo (Adegoke, Fini, 2012).

Além disso, a perda de massa muscular com o passar da idade (sarcopenia) é reconhecida como uma grande preocupação à saúde, uma vez que tem sido associada ao aumento da incapacidade funcional, perda de independência, e diminuição da expectativa de vida (Little, Philipis, 2009; Drummond e colaboradores, 2008).

Devido a isso, o aumento da massa muscular esquelética pode ser obtido através do treinamento resistido (Wilkinson e colaboradores, 2008), ocorrendo principalmente na forma de prescrição de treinamento (West e colaboradores, 2010), repetidas sessões de treinamento induzem períodos cumulativos de balanço proteico positivo, requerendo uma taxa de síntese proteica que exceda a taxa de degradação de proteína muscular (Burd e colaboradores, 2009).

Sendo assim, a ingestão de proteínas lácteas após o treinamento resistido promove uma estimulação da síntese proteica superior ao de treinamento com ingestão de proteínas à base de soja (Wilkinson e colaboradores, 2007).

Além disso, foi demonstrado que a proteína caseína era inferior à proteína do soro do leite na estimulação da síntese proteica após o treinamento de força (Tang e colaboradores, 2009).

Os suplementos de proteína do soro do leite, o mais conhecido como *Whey Proteins*, contém aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) de rápida absorção, como leucina, isoleucina, valina, possuem benefícios importantes à saúde, especialmente ao músculo esquelético (Pal, Radavelli-Bagatini, 2013).

Segundo Devries e Phillips (2015) sua digestibilidade rápida, e alta biodisponibilidade dentro do plasma e tecido muscular após seu consumo, induz a síntese proteica, essas características apontam ser a melhor opção em uma dieta pós exercício e principalmente em dietas com concentrações elevadas de proteínas maior que 1.25 g/kg/dia.

Corroborando, temos também outra substância que tem grande influência na síntese proteica e aumento de massa muscular que é o hormônio testosterona, que pode ser endógena e exógena (Mcardle e colaboradores, 2016).

Segundo Kersey e colaboradores (2012) os esteroides anabólicos androgênicos (AAS) são substâncias sintetizadas à base do hormônio testosterona, que são produtos utilizados de forma exógena, tem atuação extremamente similar nos receptores das células, efeitos ergogênicos e por consequência sendo usados para aumentar a massa muscular e força em adultos.

No esporte não é diferente, os atletas usam constantemente para aumentar performance e fisiculturistas alcançam uma hipertrofia maior e um padrão tido como mais ideal na modalidade (Graham e colaboradores, 2008).

A terapia baseada no Decanoato de Nandrolona (sintético farmacêutico similar a testosterona) tem atenuado e até mesmo retardado a degradação em ratos

machos Wistar (Qin, e colaboradores 2010), em outros casos aumentando a expressão de MTOR na célula muscular, e sua hipertrofia (Hourde, 2009).

De acordo com o exposto a síntese proteica é importante para manutenção do tecido muscular esquelético, regulada através de vias de sinalização, que controlam etapas individuais na tradução de RNA mensageiro (mRNA).

Uma via intracelular chave que coordena sinais na regulação da síntese de proteína muscular é a mammalian target of rapamycin (MTOR) (Drummond e colaboradores, 2008) está dividida em dois complexos multiproteicos distintos, o complexo MTOR 1 (mTORC1) e o complexo MTOR 2 (mTORC2) (Guertin e Sabatini, 2007), sendo o complexo mTORC1 regulador de balanço positivo no crescimento e proliferação celular, promovendo processos anabólicos (Laplante e Sabatini, 2009), enquanto a via de degradação de proteína conhecida como ubiquitina-proteassoma é o principal regulador de degradação da proteína muscular esquelética.

Esta via consiste em um sistema proteolítico dependente de adenosina trifosfato (ATP) onde os substratos são identificados para a degradação pelas moléculas de ubiquitina e segue para um processo coordenado por um trio de enzimas, ubiquitina ativadora da enzima (E1), a conjugação de ubiquitina-enzima (E2), e as ligases de ubiquitina (E3) (Murton e colaboradores, 2008) e Muscle Ring Finger (MURF-1) e Muscle Atrophy F-Box (MAFBX), são conhecidas como ligases E3 do sistema ubiquitina proteassoma e estão intimamente relacionadas com a sinalização da degradação e autofagocitose proteica (Rom, Reznick, 2016; Bondine e colaboradores, 2001).

Diante do exposto, este estudo visa investigar os efeitos do consumo de Whey Proteins, identificando os limiares na suplementação em relação a dosagem

e seus efeitos fisiológicos, associado ao treinamento resistido e a aplicação do Decanoato de Nandrolona, como variáveis que podem influenciar os sinalizadores da síntese (MTOR) e degradação proteica (MURF-1 e MAFBX).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de 12 semanas de treinamento resistido, suplementação de Whey Proteins e aplicação de Decanoato de Nandrolona na expressão gênica em vias de síntese MTOR e degradação proteica MURF-1, MAFBX da porção branca do músculo gastrocnêmio de ratos machos Wistar e estrutura histológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mensurar a expressão gênica de MTOR mRNA com e sem treinamento resistido de 12 semanas, com e sem suplementação de 2, 4 e 6 g/kg/dia de Whey Proteins e com e sem Decanoato de Nandrolona de 0,5 mg/kg/semana;

Mensurar a expressão gênica de MURF-1 mRNA com e sem treinamento resistido de 12 semanas, com e sem suplementação de 2, 4 e 6 g/kg/dia de Whey Proteins e com e sem Decanoato de Nandrolona de 0,5 mg/kg/semana;

Mensurar a expressão gênica de MAFBX mRNA com e sem treinamento resistido de 12 semanas, com e sem suplementação de 2, 4 e 6 g/kg/dia de Whey Proteins e com e sem Decanoato de Nandrolona de 0,5 mg/kg/semana;

Mensurar a estrutura histológica com e sem treinamento resistido de 12 semanas, com e sem suplementação de 2, 4 e 6 g/kg/dia de Whey Proteins e com e sem Decanoato de Nandrolona de 0,5 mg/kg/semana;

3 HIPOTEESES

3.1 HIPÓTESE H₀

Acredita-se que não há diferença na expressão gênica MTOR, MURF-1 e MAFBX e estrutura histológica do músculo gastôcnêmio, entre os que realizam ou não o treinamento resistido, suplementam com Whey Proteins, e aplicação de Decanoato Nandrolona.

3.2 HIPÓTESE H₁

Acredita-se que há diferença na expressão gênica MTOR, MURF-1 e MAFBX e estrutura histológica do músculo gastôcnêmio, entre os que realizam ou não o treinamento resistido, suplementam com Whey Proteins, e aplicação de Decanoato Nandrolona.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 SUPLEMENTAÇÃO E TREINAMENTO RESISTIDO

Wang e colaboradores (2017) em um estudo visando investigar a diferença da ingestão de proteínas em comparação a proteínas associadas a glicose anteriormente a uma sessão de treino, na síntese de proteína muscular, pouco tempo pós exercício agudo. Utilizou uma amostra de 80 ratos machos *Sprague-Dawley* com dois meses de idade (massa não informada pelo autor), os grupos foram divididos em placebo (PLA = ddH₂O), Whey Proteins (WP = 0,375 g / kg), suplemento de carboidrato mais Whey Proteins (CP = 1,2 g / kg dextrose + 0,375 g / kg Whey Proteins) e vinte ratos foram utilizados como controles sedentários (SED) sem treinamento receberam uma gavagem de ddH₂O.

O exercício dos grupos ativos consistiu em uma única sessão com 10 subidas na escada com 75% da massa corporal.

A análise dos genes expressos foi realizada 1 hora e 2 horas após a sessão de exercício.

Foi relatado aumento significativo na fosforilação de MTOR do grupo com suplemento de carboidrato mais Whey Proteins (CP) 1 e 2 horas após sessão de exercício em relação ao grupo sedentário (SED) (valor de p não informado), 1 horas após o exercício em relação ao grupo placebo (PLA) (valor de p não informado) e 2 horas após exercício em relação ao grupo Whey Proteins (WP) (valor de p não informado).

4.2 DECANOATO DE NANDROLONA

Em uma pesquisa Camerino e colaboradores (2015) verificaram o efeito do Decanoato de Nandrolona na atrofia do sóleo, induzido pela imobilização da pata traseira de camundongos C57BL/6J machos de 5 a 8 meses de idade (massa não informado pelo autor), sendo divididos em 4 grupos de 15 a 20, com a alimentação medida e controlada, o primeiro grupo somente com a atrofia induzida por imobilização por suspensão durante 2 semanas; o segundo atrofia induzida com aplicação de veículo (óleo de milho em 10% de etanol) com aplicação diária durante 4 semanas; o terceiro com atrofia induzida e aplicação de Decanoato de Nandrolona 5 mg/kg 6 dias por semana durante 4 semanas (2 semanas antes da imobilização, e 2 semanas durante a imobilização); e no quarto grupo foi feito somente o controle sem intervenções.

Foi relatado diferença estatística significativa na expressão gênica MURF-1 no grupo com nandrolona em relação ao controle ($p < 0,0077$), mas não foi significativo em relação ao grupo com imobilização e aplicação de veículo ($p < 0,5387$) e ao grupo imobilizado ($p < 0,7981$), porém em relação a expressão gênica de MTOR não mostrou diferença em todos os grupos ($p < 0,5772$).

White e colaboradores (2013) verificaram o efeito da disponibilidade androgênica na regulação do músculo Akt / mTORC1 / FoxO3a no músculo esquelético e miotubos C2C12 cultivados, utilizando três grupos de camundongos C57BL/6 machos (tamanho da amostra e massa não informado pelo autor) com 8 semanas de idade sendo o primeiro somente com a aplicação de veículo (Sham) durante 7 dias, o segundo somente camundongos castrados sem aplicação de

Decanoato de Nandrolona e o terceiro com castração e aplicação de Decanoato de Nandrolona 6mg/kg durante 7 dias.

Encontrou-se a diferença significativa na fosforilação de MTOR no grupo castrado com Decanoato de Nandrolona, apresentando níveis superiores em relação ao grupo SHAM (valor de p não informado); o grupo Decanoato de Nandrolona apresentou quedas nos níveis de expressão de MURF-1 em 60% relação ao grupo castrado ($p < 0,001$).

Conclui-se que a terapia com Decanoato de Nandrolona restaurou os efeitos deletérios da castração, restaurando a expressão de MTOR e reduzindo a expressão de MURF-1 em camundongos.

Hourdé e colaboradores (2008) analisaram o efeito de doses fisiológicas no musculo esquelético sóleo e osso tibia em 48 ratos machos Wistar orquiectomizados com 6 meses de idade (massa não informada pelo autor) dividido em 4 grupos de 12 nas seguintes características: Operado com veículo (SHAM), orquiectomizado (ORX), orquiectomizado com di-hidrotestosterona 150 mg liberado durante 90 dias através de uma pílula (DHT), orquiectomizado com aplicação de Decanoato de Nandrolona 3 mg/kg/dia durante 3 meses (NAN).

Foi mostrado não haver diferença significativa entre todos os grupos na via de sinalização Akt/MTOR, contudo o grupo orquiectomizado que fez tratamento com nandrolona (NAN) apresentou melhora significativa na força absoluta máxima, força máxima relativa ao peso e resistência a fadiga em relação ao grupo orquiectomizado (ORX) (valores de p não informados pelo autor).

Zhao e colaboradores (2007) realizaram um estudo que visa verificar os efeitos dos esteroides anabolizantes em atrofia muscular por desuso, utilizando 116 ratos Wistar com massa 200g (idade não informado pelo autor), divididos em grupo 1 que foram receberam tratamento com veículo(proprilenoglicol através de implante subcutâneo “Alzet pumps”) diariamente e Decanoato de Nandrolona (0.75 mg/kg/semana através de implante subcutâneo “Alzet pumps” mais aplicações de 2,8 mg/kg/dia) e eutanasiados com 3, 7 ou 14 dias após uma cirurgia de transecção do nervo ciático; grupo 2 receberam tratamento com veículo(proprilenoglicol através de implante subcutâneo “Alzet pumps”) diariamente e Decanoato de Nandrolona (0.75 mg/kg/semana através de implante subcutâneo “Alzet pumps” mais aplicações de 2,8 mg/kg/dia) e eutanasiados com 31, 35, ou 56 dias após uma cirurgia de transecção do nervo ciático.

A terapia com Decanoato de Nandrolona em ratos com nervo ciático transeccionados demonstrou a reduzir expressão de MAFBX a partir do trigésimo quinto dia ($p < 0,02$), de MURF-1 no trigésimo quinto ($p < 0,02$) e quinquagésimo segundo ($p < 0,032$).

4.3 DECANOATO DE NANDROLONA E TREINAMENTO RESISTIDO

Steiner e colaboradores (2016), em um estudo buscou determinar se os andrógenos alteram os diferentes componentes do balanço proteico em resposta a uma única sessão exercício de resistência simulado por estímulo elétrico em camundongos machos C57BL/6NHsd, com 9 semanas de idade (tamanho da amostra não informada pelo autor), os grupos foram divididos entre os que

realizaram uma operação de simulação ou castração, 7 a 8 semanas antes da sessão de exercício simulada, são eles: Sham (realizaram operação simulada) e Castrados (passaram por operação de castração). Foi demonstrado que após uma única sessão de exercício simulado, as expressões de MURF-1 e MAFBX não apresentaram diferença significativa entre antes e pós sessão de exercício dentro dos grupos e entre os dois grupos.

Zeng e colaboradores (2017) em seu estudo visou investigar os efeitos dos androgenós exógenos e do exercício de resistência, durante o processo de hipertrofia do músculo esquelético com foco no papel da sinalização MTOR, utilizando 24 ratos machos *Sprague–Dawley* com 8 semanas de idade e $290,9 \pm 13,5$ g de massa, os ratos foram submetidos a 4 dias de adaptação de exercícios na esteira, e foram distribuído aleatoriamente em quatro grupos com o n=6 são eles: SHAM + SED (operação simulada de implantação de DHT subcutâneo sem exercício); SHAM + EX (operação simulada de implantação de DHT subcutâneo com exercício); DHT + SED (operação de implantação de DHT 50mg subcutâneo sem exercício); DHT + EX (operação implantação de DHT 50mg subcutâneo com exercício). Os ratos dos grupos de exercício passaram por 10 dias de protocolo de treinamento na esteira em uma velocidade de 20m/min com inclinação de 10% durante 60 minutos por dia, foi analisado a expressão de MTOR do musculo gastrocnêmio.

Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos SHAM + EX, DHT + SED, DHT + EX em relação ao grupo SHAM + SED e DHT + EX em relação ao grupo DHT + SED na fosforilação de MTOR (valores de p não informado).

Conclui-se que o estudo demonstrou que a combinação de protocolo de treinamento com o uso de DHT pode promover um efeito mais desejável na promoção de síntese e sinalização de proteínas musculares, reguladas principalmente pela ativação de via MTOR.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES E ASPECTOS ETICOS

A pesquisa tem aprovação do Comissão de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA), sob registro nº 23115.010155/2019-81, os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2012).

5.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

5.2.1 Cálculo amostral

O processamento do cálculo amostral foi realizado por meio do software G Power, versão 3.1.9.2. Assim, elegeu-se como variável desfecho o peso do músculo gastrocnêmio (g). O cálculo foi baseado na detecção de diferenças de 0,42 g entre os grupos, assumindo um desvio padrão de 0,2435 pontos, e um tamanho de efeito de 1,742 com base no estudo de Macêdo, 2018. Assim, considerando-se um poder estatístico de 80% e alfa de 5%, foi estimado um número de 7 animais por grupo.

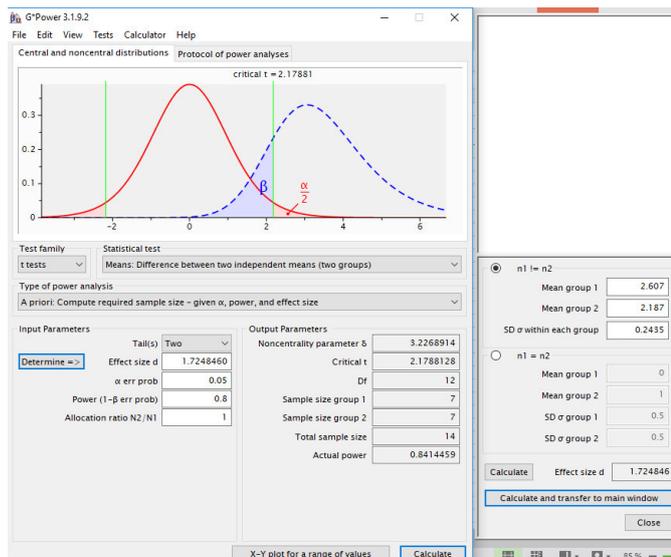


Figura 1: Cálculo do tamanho do efeito e tamanho amostral no programa G Power.

5.2.2 Amostra

O estudo foi realizado com 97 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar com idade inicial de 60 dias e massa corporal de 200 a 350 g, procedentes do Biotério da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. Os ratos permaneceram sob condições higiênicas em gaiolas coletivas (dimensões 41x34x16cm), em grupos de 5 ratos por gaiola, mantidos em uma sala climatizada com controle de temperatura entre 24°C a 28°C, e sob ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas e foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores Nuvilab® (Colombo, Paraná, Brasil) e água *ad libidum*.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 11 grupos compostos 6 a 11 ratos cada:

- 1) Grupo Controle sem intervenção (C) (n=10);

- 2) Grupo Suplemento (W2) (n=11): suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 3) Grupo Suplemento (W4) (n=10) suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 4) Grupo Suplemento (W6) (n=7): suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 5) Grupo Controle Treinamento (TC) (n=10): Grupo de Treinamento resistido sem suplementação;
- 6) Grupo treinamento e suplementado (TW2) (n=9): treinamento resistido e suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 7) Grupo treinamento e suplementado (TW4) (n=6): treinamento resistido e suplementado com 4g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 8) Grupo treinamento e suplementado (TW6) (n=7): treinamento resistido e suplementado com 6g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem;
- 9) Grupo suplementado e aplicação de Decanoato de Nandrolona (W2D) (n=10): suplementado com 2g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem e aplicação de Decanoato de Nandrolona 0,5 mg/kg;
- 10) Grupo Controle Treinamento e aplicação de Decanoato de Nandrolona (TCD) (n=10): Grupo de Treinamento resistido e aplicação de Decanoato de Nandrolona 0,5 mg/kg;
- 11) Grupo treinamento, suplementação e aplicação de Decanoato de Nandrolona (TW2D) (n=8): treinamento resistido, suplementado com

2g/kg/dia de Whey Proteins pelo método de gavagem e aplicação de Decanoato de Nandrolona 0,5mg/kg;

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

5.3.1 Inclusão

Rato macho saudável da linhagem Wistar, com no mínimo 60 dias de vida e massa corporal entre 200g a 350 g.

5.3.2 Exclusão

Ratos que se indisponem a fazer o teste de Peso Máximo Carregado (PMC), e/ou treinamento resistido foram realocados para o grupo controle.

5.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.4.1 Controle da massa corporal

A massa corporal do rato foi medida no início de cada semana para registro semanal e ajuste das doses de Whey Proteins, Decanoato de Nandrolona e nos dias de teste de peso máximo carregado, para cálculo da carga da primeira subida

no teste. Para isso, os ratos foram colocados em contensor e medidos em balança semi analítica (Modelo ES220, Weblabor, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,1g.

5.4.2 Suplementação/ gavagem

A suplementação de Whey Proteins foi administrada através do método gavagem, que consiste na introdução de uma agulha lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago. A agulha é do tipo ponta-bola (Bonther®) de aço inox, cânula de diâmetro 1,2 mm com esfera de 2,3 mm, raio de 40 mm e comprimento de 54 mm para evitar o risco de lesão ao esôfago, sendo necessária a contenção do animal de modo que mantenha a sua cabeça imobilizada (Neves, Mancini Filho, Menezes, 2013).

A gavagem foi realizada diariamente durante 12 semanas de estudo, e os ratos passarão por 3 sessões de adaptação à gavagem antes do início do protocolo experimental. A dose diária de Whey Proteins foi dividida em 3 gavagens de 5 mL cada, que corresponde à capacidade de dieta líquida de um rato com 250 g (2ml a cada 100 g), com intervalo de 60 minutos entre gavagens, pois esse tempo corresponde ao tempo médio de esvaziamento gástrico dos ratos para dietas a base de líquido (Andersen e colaboradores, 2004) em todos os grupos. Nos grupos suplementados cada gavagem contém a dosagem específica (2g/kg/dia, 4g/kg/dia e 6g/kg/dia) e os grupos controle e treinamento controle receberam o mesmo volume com água. O peso dos ratos foi avaliado semanalmente para readequação da quantidade da suplementação.

A suplementação com Whey Proteins segue as dosagens 2, 4 e 6g/kg/dia dissolvido em água filtrada, tendo concentração comum de 0,189g/mL do

Suplemento H.I Whey: Essencial Nutrition® (São José, Santa Catarina, Brasil) conforme o estudo de Macêdo (2018) onde é apresentado 28 laudos comprovando sua pureza e integridade, essa solução apresenta o pH 6.8 em temperatura ambiente, medido através do Phmetro QUIMIS®, QA338-ECV e solução apresenta viscosidade baixa. Conforme laudos técnicos físico-químico da Essencial Nutrition®, que corresponde a 0,166g/mL de proteínas do soro do leite. A medida do Whey Proteins para preparação da solução padrão foi realizada em balança analítica (AD200, Marte científica, São Paulo Brasil) com precisão de 0,001g. A composição nutricional e o aminograma da H.I Whey: Essencial Nutrition® (São José, Santa Catarina, Brasil) estão descritos nos quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1: Composição Nutricional da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Proteins.

Informação Nutricional		
Quantidade por porção: 25g		Valor diário (%)
Valor energético	93kcal=391kJ	5%
Carboidratos, dos quais:	0g	0%
- Polióis	0g	**
- Sacarose	0g	**
- Lactose	0g	**
- Glicose	0g	**
Proteínas	22g	29%
Gorduras totais	0g	0%
Gorduras saturadas	0g	0%
Gorduras trans	0g	**
Fibra alimentar	0g	0%
Sódio	88mg	4%
Cálcio	118mg	12%
Fósforo	63mg	9%
Magnésio	22mg	8%

Quadro 2: Aminograma da Proteína do Soro do Leite H.I Whey Proteins.

Aminograma	
Quantidade por porção (25 gramas)	
Aminoácidos	Gramas (g)

Ácido aspártico	2,53g
Ácido glutâmico	4,00g
Alanina	1,10g
Arginina	0,46g
Cistina	0,51g
Fenilalanina	0,66g
Glicina	0,37g
Histidina	0,39g
Isoleucina	1,53g
Leucina	2,37g
Lisina	2,21g
Metionina	0,48g
Prolina	1,34g
Serina	1,02g
Tirosina	0,64g
Treonina	1,61g
Triptofano	0,46g
Valina	1,29g

5.4.3 Controle do consumo de Ração

O consumo de ração foi controlado diariamente, sendo realizado sempre antes do protocolo experimental. Foi padronizada a quantidade de 300g para cada caixa. Para isso, será utilizada balança semi analítica (Modelo ES220, Weblabor, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,1g.

5.4.4 Treinamento resistido

5.4.4.1 Protocolo de adaptação ao treinamento

Os ratos foram gradualmente adaptados para o ato de escalar com equipamento de carga preso na cauda sem adição de carga por 3 dias não consecutivos (Intervalo de 48 horas entre sessões) que foi realizado em uma escada vertical (110 cm de altura, 18 cm de largura, grade com espaçamento de 2cm entre os degraus e inclinação de 80°, com caixa de 20x20x20 cm no topo da escada). Este modelo (figura 2) de treinamento resistido é proposto por Hornberger, Farar (2004).



Figura 2: Escada para realização de treinamento resistido. Fonte Laboratório LAFIPEMA.

5.4.4.2 Teste de carga máxima (TCM)

Dois dias após o procedimento de familiarização, foi executado o Teste de Carga Máxima para todos os ratos dos grupos de treinamento. Para a subida inicial,

o peso carregado é de 75% da massa corporal do rato. Em seguida, foi adicionada uma carga de 30 gramas com um período de descanso de 120 segundos entre cada subida, até atingir a carga máxima, exatamente quando o rato não conseguir mais subir toda a extensão da escada entre 4-9 tentativas. A falha é definida quando o rato não conseguiu continuar a subir a escada após 3 estímulos consecutivos na cauda (com o uso de pinças). A maior carga que o rato conseguiu suportar por toda a extensão da escada é considerado o Peso Máximo Carregado (PMC) para aquela sessão de teste (Hornberger, Farrar, 2004; Krug e colaboradores, 2016).

Este procedimento foi aplicado a cada duas semanas durante as 12 semanas de treinamento, a fim de determinar a intensidade de treinamento e acompanhar as adaptações da força muscular.

5.4.4.3 Protocolo de treinamento resistido

Após o teste de carga máxima (TCM), foi iniciado o programa de treinamento resistido, com frequência de três vezes semanais, em dias alternados (segundas, quartas e sextas) durante 12 semanas. Cada sessão consistiu em 4 subidas com intervalo de 120 segundos na escada com 50%, 75%, 90% e 100% do peso máximo carregado, respectivamente, sendo o protocolo de exercício, adaptado de Hornberger, Farrar, (2004).

5.4.5 Aplicação de Decanoato de Nandrolona

A aplicação foi intramuscular, a substância foi injetada no músculo da porção posterior das patas traseiras, mantendo distância do fêmur e nervo ciático, sendo o rato manualmente contido, a ponta da agulha foi inserida através da pele e no músculo. Aspirando brevemente com a seringa antes de injetar a substância, para verificar se haverá retorno de sangue, caso a agulha penetre um vaso (SBCAL/COBEA, 2012), a dose definida foi 0,5 mg/kg, inferior a dose fisiológica de 0,7mg/kg (Matushima, 2018). O peso dos ratos foi avaliado semanalmente para readequação da concentração, mantendo a dose de 0,5 mg/kg Decanoato de Nandrolona.

5.4.6 Eutanásia

Vinte e quatro horas após os procedimentos experimentais finais e com 12 horas de privação de alimentos, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Xilasina (10mg/kg de massa corporal) e Cetamina (75mg/kg de massa corporal), conforme sugerido por SBCAL/COBEA (2012) Krug e colaboradores (2016); Macedo e colaboradores, (2014) e posterior decapitação.

Após a retirada do material biológico utilizado para as análises, as carcaças foram embaladas em saco plástico, devidamente lacradas e encaminhadas ao biotério central da Universidade Federal do Maranhão para procedimento de incineração. Todos os procedimentos foram executados seguindo as recomendações do (SBCAL/COBEA, 2012).

5.4.7 Extração do Músculo e Armazenamento

A obtenção do tecido muscular seguirá a recomendação de Xia e colaboradores, (2016) e Hornberger e Farrar, (2004) dessa forma foi retirado o músculo gastôcnêmio. O músculo gastôcnêmio da pata esquerda do rato foi embebido em formaldeído a 10% por 24 horas e posteriormente em álcool etílico por 7 dias para posterior análise histológica. A porção superficial (branca) de músculo gastrocnêmico e o FHL da pata direita serão submersas em solução estabilizadora de RNA (Invitrogen™: RNAlater™) em seguida armazenados a -80°C para posterior análise em *Polymerase Chain Reaction - Real Time* (PCR-RT).

5.4.8 Expressão Gênica de MTOR, MURF-1, MAFBX

5.4.8.1 Extração de RNA

Para a adequada extração e quantificação de RNA, foi utilizado o seguinte protocolo:

1) Após a retirada do tecido da refrigeração a -80°C, as amostras de trabalho foram cortadas e pesadas entre 0,25 a 20 miligramas e armazenadas em um tubo estéril;

2) Para cada amostra irá ser adicionados 500 µl da solução de tampão LBA e TG Buffer, acrescidos de 500 µl do tampão de extração de RNA (RDB), em seguida, incubar por um 1 minuto a temperatura ambiente;

3) Após a incubação, foi utilizado um homogeneizador de tecidos para facilitar a reação, em seguida, o material será centrifugado por 3 minutos a 10.000 x *g* para a retirada dos debrís insolúveis.

4) Após esse processo, o lisado será transferido para um novo tudo estéril, tomando cuidado para que não seja transferido nenhum debrí. Em seguida, foi adicionado 340 µl de isopropanol;

5) Em seguida, foi preparado o conjunto de 1 coluna (ReliaPrep™ Minicolumn), 2 tubos coletores e 1 tubo de eluição para cada amostra. Em sequência, serão adicionados até 700 µl do lisado para a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugar-se-á por 1 minuto a 12.000 x *g*. Repetir-se essa etapa em função do volume do lisado, descartando-se o volume residual entre cada etapa;

6) Após esse processo, foram adicionados 500 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugados por 30 segundos a 12.000 x *g*, em seguida o descarte do volume residual e armazenamento a ReliaPrep™ Minicolumn em um rack refrigerado;

7) Na sequência, foi preparado o mix de incubação de DNase I, ao combinar-se, nessa ordem, 24 µl do Buffer de núcleo amarelo, 3 µl de Cloreto de Manganês (MnCl₂) a 0,09 Molar e 3 µl enzima DNase I para cada reação. Em seguida, foram aplicados 30 µl do mix diretamente a membrana da ReliaPrep™ Minicolumn e incubamento por 15 minutos a temperatura ambiente;

8) Após a incubação, foram adicionados 200 µl da Column Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e o centrifugamento por 15 segundos a 12.000 x *g*. Em seguida, foram adicionados 500 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™

Minicolumn e centrifugamento por 30 segundos a 12.000 x *g*. Ao final desse processo, foi feito descarte do tubo coletor e colocou-se a ReliaPrep™ Minicolumn em um novo tubo coletor;

9) Em sequência, foi adicionado 300 µl de RNA Wash Solution a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugado por 2 minutos a 12.000 x *g*;

10) Após essa etapa, ocorreu o descarte o tubo coletor e encaixamento a ReliaPrep™ Minicolumn em um tubo de eluição. Em seguida, será adicionado 30 µl de Nuclease Free Water a ReliaPrep™ Minicolumn e centrifugado por 1 minuto 12.000 x *g*.

11) Por fim, descartado a ReliaPrep™ Minicolumn, tampado o tubo de eluição contendo o RNA purificado e feito armazenamento em refrigeração a -80°C para posterior conversão em c-DNA.

5.4.8.2 Transcriptase reversa

Para a, Transcriptase reversa utiliza-se o seguinte protocolo:

1) Inicialmente, o tampão 5x SSIV Buffer será pré-aquecido a temperatura ambiente e reservado para utilização posterior;

2) Em seguida, prepara-se o mix de anelamento, ao combinar-se, nessa ordem, 1 µl de Random hexamers, 1 µl de dNTP mix a 10 mM, 13 µl de DEPC - água tratada e 11 µl de RNA purificado para cada amostra;

3) Após essa etapa, será aquecido o mix por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incuba-se no gelo por pelo menos 1 minuto;

4) Em seguida, prepara-se o mix de transcrição reversa, ao combinar-se, nessa ordem, 4 μ l do tampão 5x SSIV Buffer, 1 μ l de DTT a 100 mM, 1 μ l de inibidor de ribonuclease e 1 μ l da SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (200 U / μ l) para cada amostra;

5) Após essa etapa, adiciona-se 7 μ l do mix de transcrição reversa para cada amostra ao mix de anelamento, e incuba-se a reação por 10 minutos a 23°C, em seguida por 10 minutos a 55°C e por 10 minutos a 80°C. Em seguida armazena-se o DNA complementar (c-DNA) em refrigeração a - 20°C.

5.4.8.3 Reação de cadeia de polimerase (Power Syber Green)

Para a, Power Syber Green utiliza-se o seguinte protocolo:

1) Inicialmente, para a reação de cadeia de polimerase, prepara-se o mix Power Syber Green, ao combinar-se, nessa ordem, 6 μ l de Power Syber Green, 0,4 μ l do primer F, 0,4 μ l do primer R e 4,5 μ l de água ultrapura para cada gene alvo;

2) Após essa etapa, homogeneíza-se e distribuiu-se 11 μ l do mix em cada poço da placa, de acordo com o número de reações;

3) Em seguida, acrescenta-se 1 μ l c-DNA das amostras em cada poço da placa, após esse processo, veda-se a placa. Em ocasiões em que houve formação de bolhas na placa, utiliza-se o spin. Após preparação prévia, coloca-se a placa no aparelho StepOne e inicia-se a reação;

4) Utiliza-se a seguinte ciclagem: 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C a 15 segundos, 55°C a 30 segundos e 72°C a 30 segundos.

5.4.8.4 Análise quantitativa da transcrição reversa por PCR tempo real

O PCR-RT foi realizado no Sistema de Detecção de Sequência ABI 7300 para os seguintes primers:

1) **MTOR** rato (NM_019906) forward, 5'-TCTTCTTCCAGCAAGTTCAGC-3', e reverso, 5' GAATCAGACAGGCACGAAGG-3' (tamanho do produto de 97 pb);

2) **MAFBX** rato (NM_133521) forward, 5'-GCAAAACATAAGACTCATACG-3', e reverso, 5' GTAGAGTGGTCTCCATTTCG-3' (tamanho do produto 83 pb);

3) **MURF-1** rato (NM_080903) forward, 5'-AGGTGAAGGAGGAACTGAG-3', e reverso, 5' AACTGCTCTCGGTACTGG-3' (tamanho do produto de 86 pb).

5.4.9 Análises Histológicas

Os procedimentos histológicos foram realizados conforme preconiza Caputo, Gitirana e Manso (2010) e descritos a seguir.

Para a fixação, o músculo gastrocnêmio foi embebido em formaldeído a 10% por 24 horas e posteriormente em álcool etílico por 7 dias.

Em seguida, o músculo foi seco com papel filtro e, com auxílio de um paquímetro científico da marca Messen®, com graduação de 0,01 mm, com

amplitude entre 0 a 150 mm, realizou-se a mensuração de uma extremidade a outra e realizou-se uma secção transversal no ponto médio, em seguida realizaram-se duas secções transversais de 2-3mm, um a esquerda e outro a direita.

Após realizados os procedimentos de corte e mensuração do músculo gastrocnêmio, as amostras foram armazenadas em cassetes histológicos e identificadas. Seu processamento foi realizado no processador automático de tecidos para histologia da marca Luptec, iniciando com a desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes, variando de álcool 70% a absoluto, seguido de clarificação com xilol e posterior impregnação em parafina.

Em seguida foram realizados cortes de 4 μm de espessura em microtomo rotativo de parafina da marca YIDI. Os cortes foram corados com hematoxilina e ensina e montados para posterior análise histológica e descrição e avaliação da dimensão das fibras musculares.

A mensuração das células musculares foi realizada conforme o preconizado por Bodine e colaboradores (2012) e ilustrada na figura 3, onde foram analisadas e mensuradas 150 células para cada amostra, com o auxílio de microscópio óptico biológico trinocular da marca ANATOMIC, no aumento de 40 vezes, obtendo-se a área celular em micrômetros quadrados (μm^2). As imagens foram analisadas usando o programa AxioVision, versão 4.9.1.

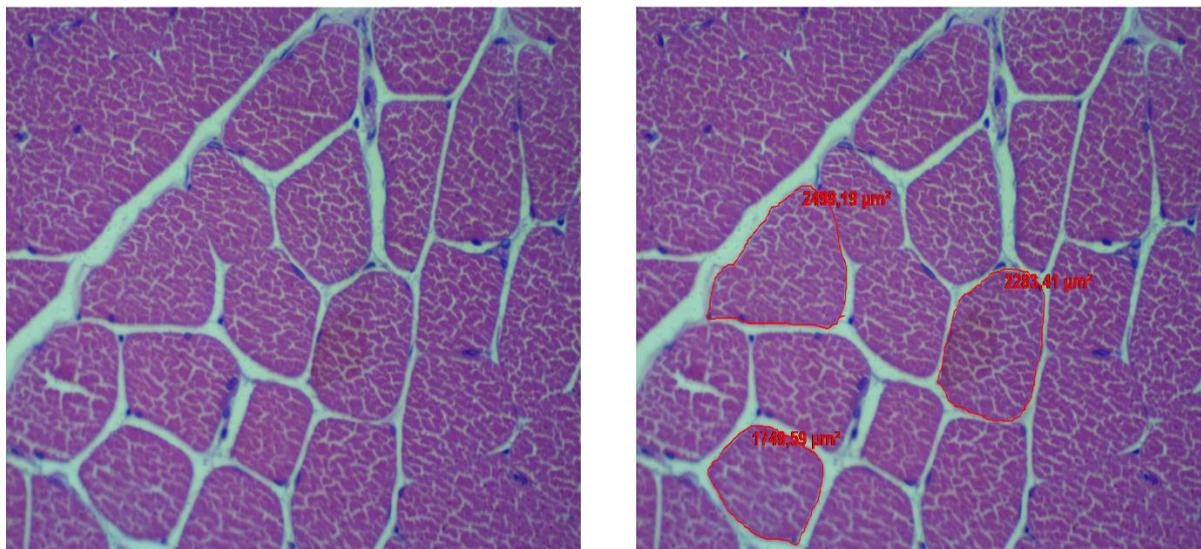


Figura 3: Mensuração de área celular do músculo gastrocnêmio. Fonte: Laboratório LAFIPEMA.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas quanto a sua distribuição através do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados estão apresentados em média e erro padrão, porcentagem e expressão relativa. Para a comparação semanal da massa corporal absoluta, delta de variação da massa corporal, consumo de ração, consumo de proteína e peso máximo carregado será utilizado teste ANOVA *two-way*. Para avaliação da massa do músculo gastrocnêmio e a expressão gênica será utilizado teste ANOVA *one-way*. O *post-hoc* de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre todas as análises e nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O *software* utilizado para as análises estatísticas é o *Graphpad Prism versão 8.02*.

6 RESULTADOS

As variáveis apresentadas fazem referência a massa corporal total e delta de variação de massa corporal total, consumo de whey proteínas, mudanças no peso máximo carregado nos deltas, peso do músculo gastrocnêmio esquerdo relativo à 100g do animal, diâmetro histológico do músculo gastrocnêmio esquerdo e variação da expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX do músculo gastrocnêmio direito.

6.1 MASSA CORPORAL TOTAL E RELATIVA

Tabela 1- Massa Corporal Total (MCT), Relativa em média, Erro padrão e Percentual

	S0 (g)	S12 (g)	Δ Massa Corporal (g)	Δ Massa Corporal (%)
C (n=10)	290,46 ± 5,17	464,81 ± 10,91	174,35 ± 6,33	59,9 ± 1,54
W2 (n=11)	299,57 ± 6,37	454,96 ± 8,94	155,39 ± 4,44	52,01 ± 1,59
W4 (n=10)	267,5 ± 8,26	417,85 ± 11,73	150,35 ± 8,14	56,7 ± 3,56
W6 (n=7)	254,84 ± 7,71	411,94 ± 17,42	157,10 ± 10,47	61,4 ± 2,74
TC (n=7)	287,07 ± 3,70	453,14 ± 9,55	166,07 ± 6,94	57,8 ± 2,10
TW2 (n=9)	303 ± 10,55	441 ± 18,92	139 ± 11,36	46 ± 3,07
TW4 (n=6)	290,68 ± 16,38	422,17 ± 9,22	131,48 ± 14,79	46,97 ± 6,92
TW6 (n=7)	297,57 ± 6,15	439,47 ± 13,48	141,90 ± 9,97	47,66 ± 3,09
WD2 (n=10)	254,67 ± 7,01	409,43 ± 14,24	154,76 ± 7,70	60,56 ± 1,63
TCD (n=10)	249,88 ± 5,88	399,83 ± 9,42	149,95 ± 9,84	60,59 ± 4,55
TWD2 (n=8)	249,95 ± 6,71	395,63 ± 16,02	145,98 ± 13,97	58,49 ± 5,79

Δ = S12-S0; S0 = Inicial; S12 = Final C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; ; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana

Os seguintes grupos apresentaram diferença significativa na semana 0, são eles : C vs. TCD (p=0,0209), C vs. TWD2 (p=0,0390), W2 vs. W6 (p= 0,0168), W2 vs. WD2 (p= 0,0044), W2 vs. TCD (p= 0,0009), W2 vs. TWD2 (p= 0,0025), W6 vs. TW2 (p=0,0115), TW2 vs. WD2 (p= 0,0032), TW2 vs. TCD (p=0,0007), TW2 vs. TWD2 (p= 0,0018), TW4 vs. TCD (p= 0,0263), TW4 vs. TWD2 (p= 0,0465), TW6 vs. WD2 (p= 0,0323), TW6 vs. TCD (p= 0,0098), TW6 vs. TWD2 (p= 0,0179), como

relatado na figura 4, os grupos WD2, TCD e TW2D apresentam valores de massa corporal total que diferem dos outros grupos de forma significativa.

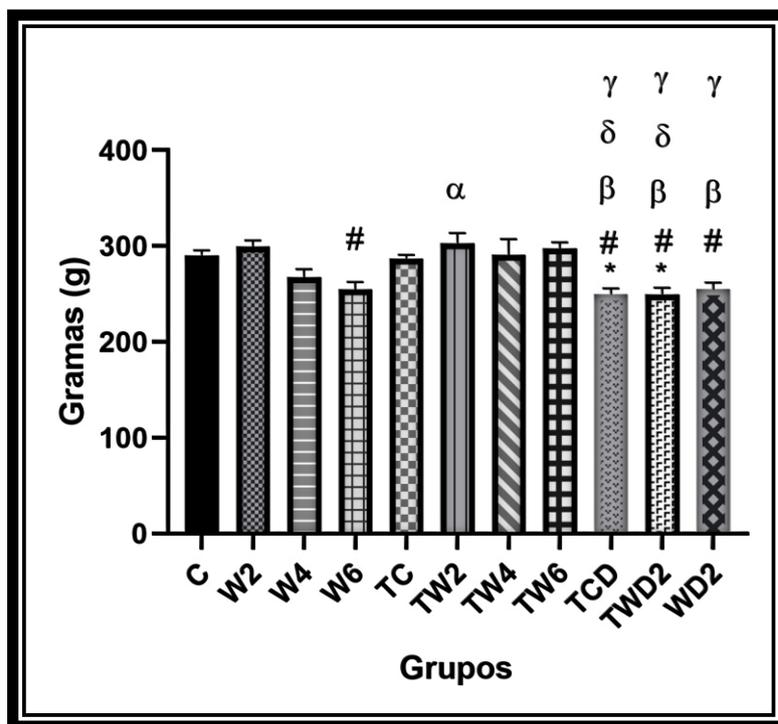


Figura 4 – Massa corporal total inicial de todos os grupos.

Legenda: C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos): *= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo C são eles: C vs. TCD ($p=0,0209$), C vs. TWD2 ($p=0,0390$); #= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo W2 são eles: W2 vs. W6 ($p=0,0168$), W2 vs. WD2 ($p=0,0044$), W2 vs. TCD ($p=0,0009$), W2 vs. TWD2 ($p=0,0025$); α= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo W6 são eles: W6 vs. TW2 ($p=0,0115$); β= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo TW2 são eles: TW2 vs. WD2 ($p=0,0032$), TW2 vs. TCD ($p=0,0007$), TW2 vs. TWD2 ($p=0,0018$); δ= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo TW4 são eles: TW4 vs. TCD ($p=0,0263$), TW4 vs. TWD2 ($p=0,0465$); γ= indica diferença significativa na Semana 0 em relação ao grupo TW6 são eles: TW6 vs. WD2 ($p=0,0323$), TW6 vs. TCD ($p=0,0098$), TW6 vs. TWD2 ($p=0,0179$).

O delta de massa corporal final não apresentou diferença significativa entre todos os grupos, como mostra a figura 5.

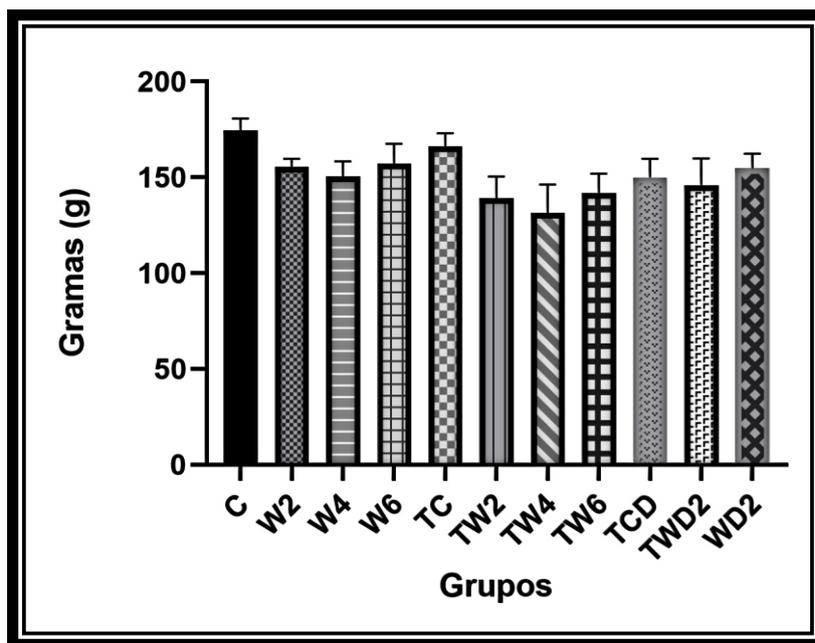


Figura 5 – Delta da massa corporal total final de todos os grupos.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos) não apresentou diferença significativa.

6.2 CONSUMO DE WHEY PROTEINS

O consumo absoluto de Whey Proteins demonstrou diferença significativa em todos grupos entre a semana 0(S0) e semana 12(S12), com valor de $p(<0,001)$.

Tabela 2- Consumo absoluto de whey proteins (g. semana⁻¹) em média e erro padrão

	S0	S12
C (n=10)	Não Suplementado	Não Suplementado
W2 (n=11)	4,19 ±0,09	6,32 ±0,13
W4 (n=10)	7,49 ±0,23	11,64 ±0,37
W6 (n=7)	10,70 ±0,32	17,42 ±0,68
TC (n=7)	Não Suplementado	Não Suplementado
TW2 (n=9)	4,24 ±0,15	6,08 ±0,25
TW4 (n=9)	8,14 ±0,46	11,65 ±0,28
TW6 (n=7)	12,50 ±0,26	18,06 ±0,57
W2D (n=10)	3,63 ±0,09	5,73 ±0,20
TCD (n=10)	Não Suplementado	Não Suplementado
TW2D (n=8)	3,53 ±0,09	5,54 ±0,22

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana.

6.3 TESTE DE PESO MÁXIMO CARREGADO (PMC)

Tabela 3- Variação do Peso Máximo Carregado (g) em média e erro padrão conforme o reajuste a cada duas semanas do treinamento resistido.

	TC (n=7)	TW2 (n=9)	TW4 (n=9)	TW6 (n=7)	TCD (N=10)	TWD2 (N=8)
$\Delta 2$	101,57 \mp 10,09	86,24 \mp 11,28	155,57 \mp 16,19	63,41 \mp 17,41	58,98 \mp 19,46	78,65 \mp 18,51
$\Delta 4$	138,73 \mp 17,66	180,70 \mp 10,16	199,16 \mp 17,65	136,93 \mp 17,90	125,23 \mp 20,06	117,88 \mp 17,64
$\Delta 6$	207,89 \mp 25,05	195,73 \mp 7,16	226,95 \mp 16,90	156,96 \mp 19,11	135,02 \mp 19,12	134,58 \mp 23,39
$\Delta 8$	223,97 \mp 22,07	233,53 \mp 13,38	267,69 \mp 24,44	220,93 \mp 19,93	142,76 \mp 14,16	144,63 \mp 23,34
$\Delta 10$	269,38 \mp 13,08	257,83 \mp 6,63	253,93 \mp 22,93	240,82 \mp 18,08	169,93 \mp 16,42	202,85 \mp 19,82
$\Delta 12$	307,64 \mp 12,70	261,99 \mp 11,06	319,62 \mp 19,62	267,47 \mp 24,49	165,63 \mp 21,06	194,52 \mp 16,06
$\Delta 12 \%$	127,68 \mp 8,98	95,34 \mp 6,57	147,91 \mp 18,00	105,81 \mp 16,37	51,22 \mp 7,26	64,89 \mp 7,83

$\Delta 0 = S_0$; $\Delta 2 = S_2 - S_0$; $\Delta 4 = S_4 - S_0$; $\Delta 6 = S_6 - S_0$; $\Delta 8 = S_8 - S_0$; $\Delta 10 = S_{10} - S_0$; $\Delta 12 = S_{12} - S_0$. TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana.

Encontrou-se diferença na semana 0 entre os grupos TC vs. TCD ($p=0,0005$), TC vs. TWD2 ($p=0,0478$), TW4 vs. TCD ($p<0,0001$), TW4 vs. TWD2 ($p=0,0046$), TW6 vs. TCD ($p=0,0094$) mostrando um perfil com uma característica quase heterogênea entre os grupos na fase inicial, já no $\Delta 2$ houve diferença significativa somente nos grupos TW6 vs. TCD ($p=0,0238$), e no $\Delta 4$ houve diferença significativa entre os grupos TC vs. TW2 ($p=0,0049$), TC vs. TCD ($p=0,0061$), TW2 vs. TW6 ($p=0,0499$), e a última diferença apresentada foi no $\Delta 8$ entre os grupos TW2 vs. TWD2 ($p=0,0367$), no deltas seguintes a diferença pareceu estabilizar, e não ocorreu diferenças significativas.

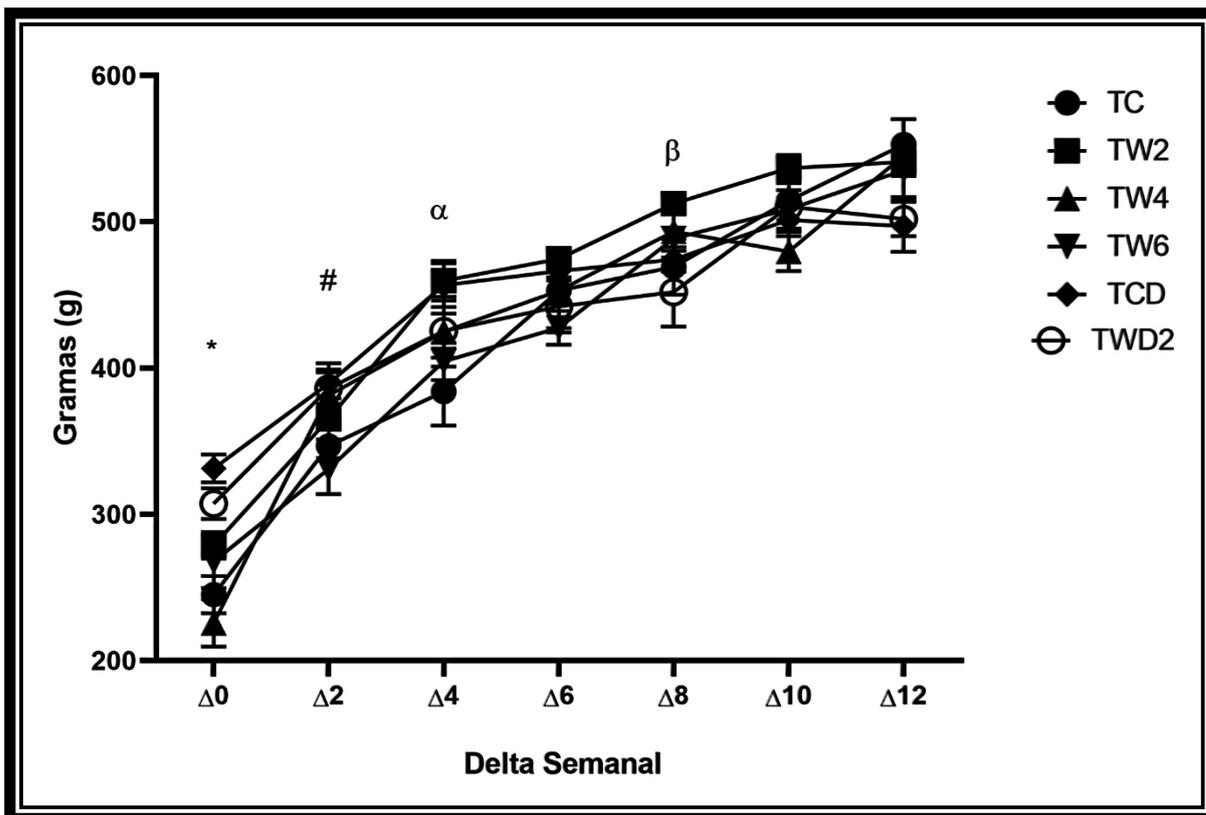


Figura 6 – Variação do Peso Máximo Carregado de todos os grupos durante 12 semanas

$\Delta 0 = S_0$; $\Delta 2 = S_2 - S_0$; $\Delta 4 = S_4 - S_0$; $\Delta 6 = S_6 - S_0$; $\Delta 8 = S_8 - S_0$; $\Delta 10 = S_{10} - S_0$; $\Delta 12 = S_{12} - S_0$. TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana. **ANOVA Two-Way post hoc Tukey** (Intergrupos). * = Foi apresentado diferença significativa na semana 0 (S0): TC vs. TCD ($p = 0,0005$), TC vs. TWD2 ($p = 0,0478$), TW4 vs. TCD ($p < 0,0001$), TW4 vs. TWD2 ($p = 0,0046$), TW6 vs. TCD ($p = 0,0094$); # = No $\Delta 2$ houve diferença significativa entre os grupos TW6 vs. TCD ($p = 0,0238$); α = No $\Delta 4$ houve diferença significativa entre os grupos TC vs. TW2 ($p = 0,0049$), TC vs. TCD ($p = 0,0061$), TW2 vs. TW6 ($p = 0,0499$); β = No $\Delta 8$ houve diferença significativa entre os grupos TW2 vs. TWD2 ($p = 0,0367$).

Os grupos TC, TW2 e TCD não apresentaram diferença significativa em relação ao delta anterior a partir da quarta semana, onde ocorre uma estabilização mais acentuada do ganho de força, respectivamente os grupos TWD2, TW4 tem esse comportamento que ocorre a partir da segunda semana e no grupo TW6 na sexta semana.

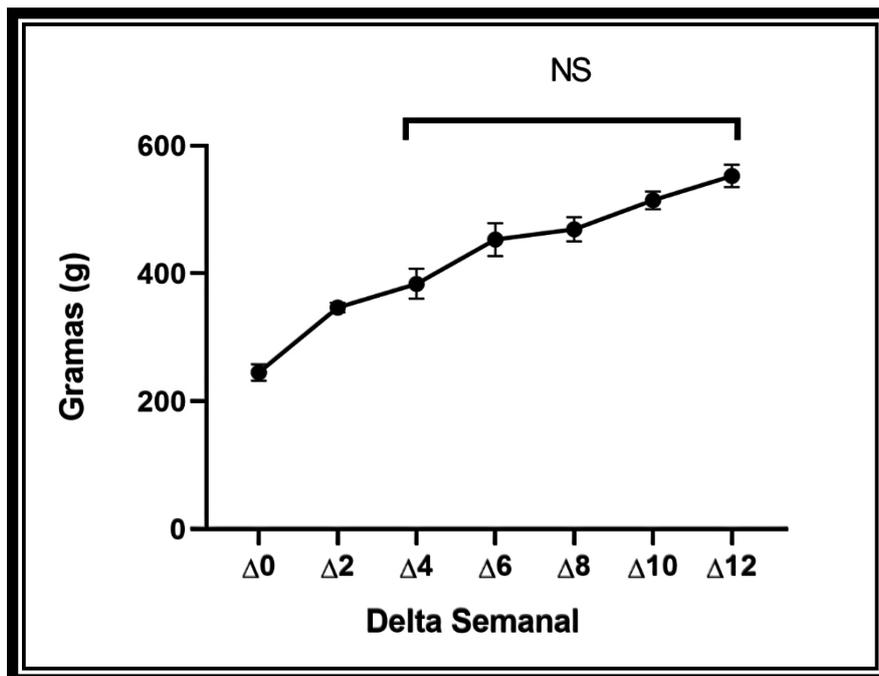


Figura 7- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TC

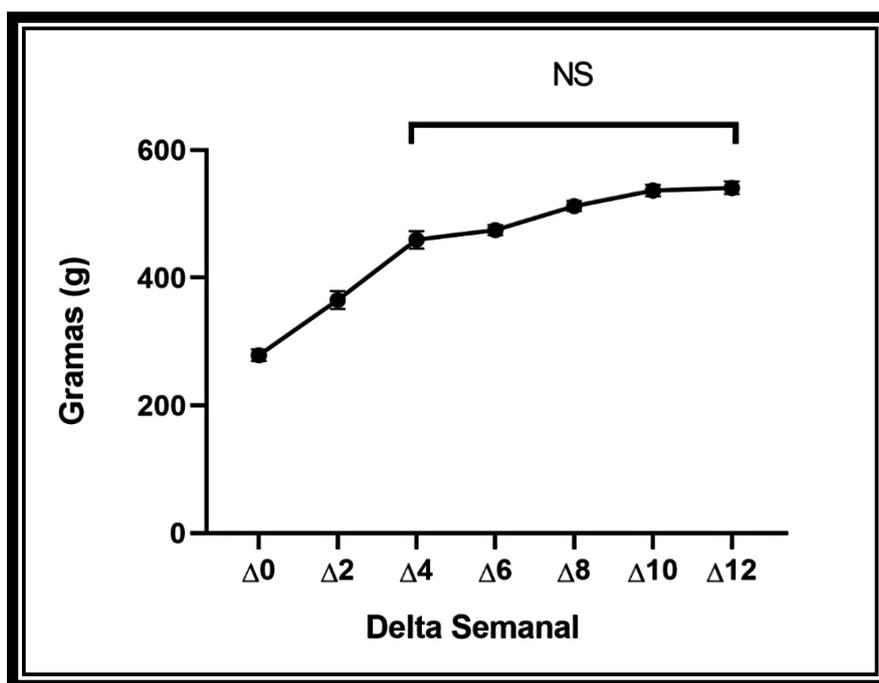


Figura 8- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW2

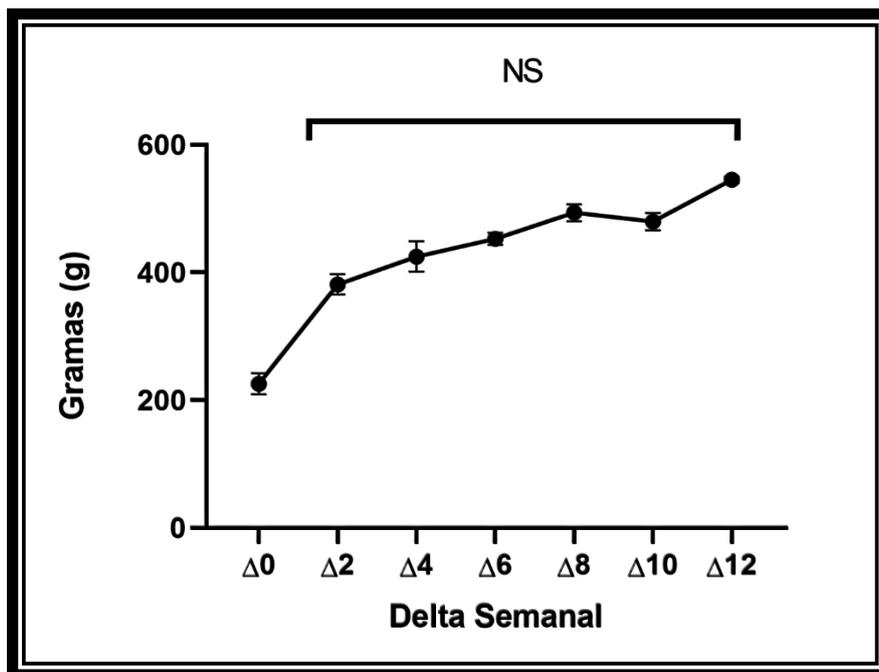


Figura 9- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW4

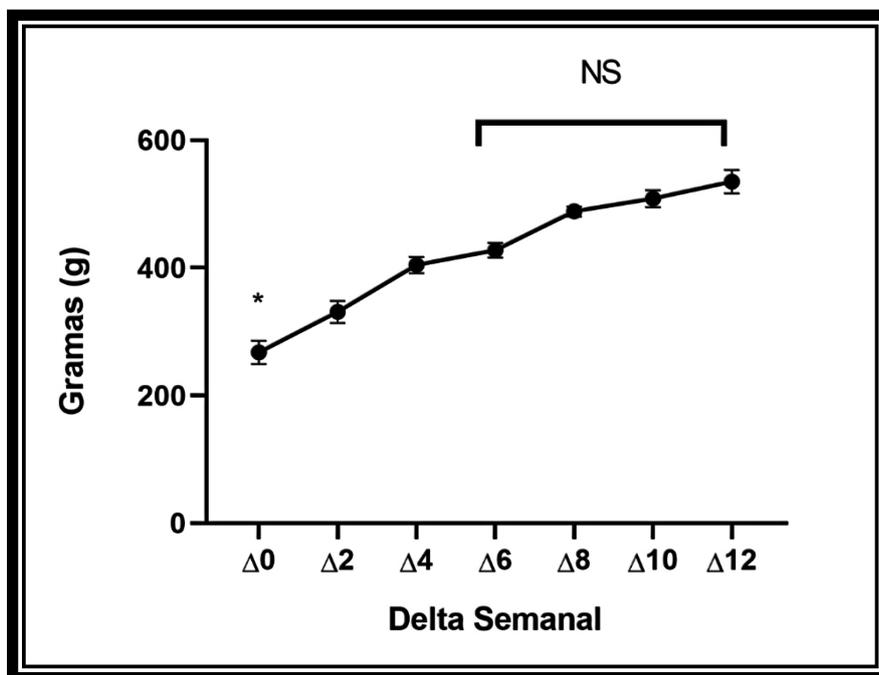


Figura 10- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TW6

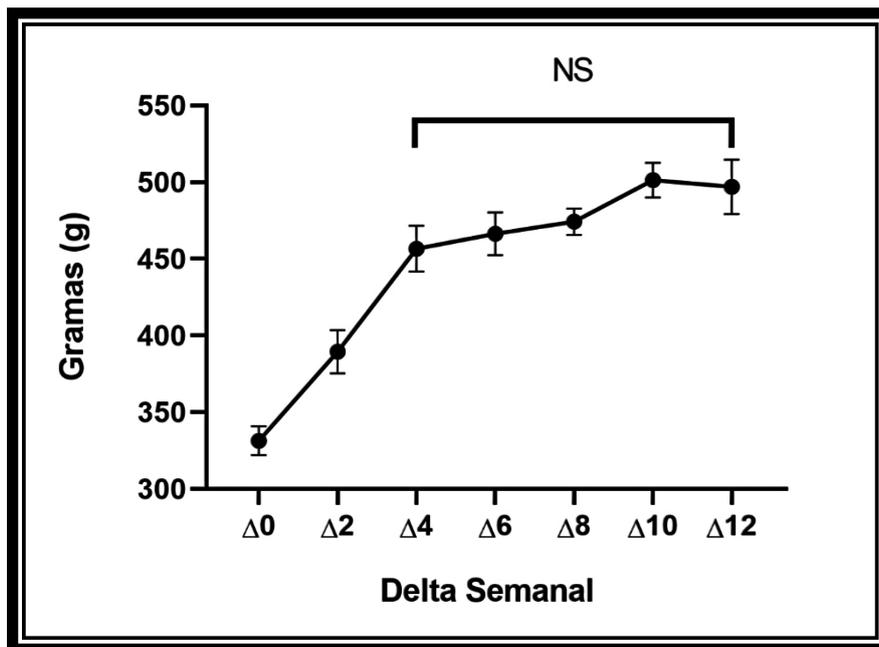


Figura 11- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TCD

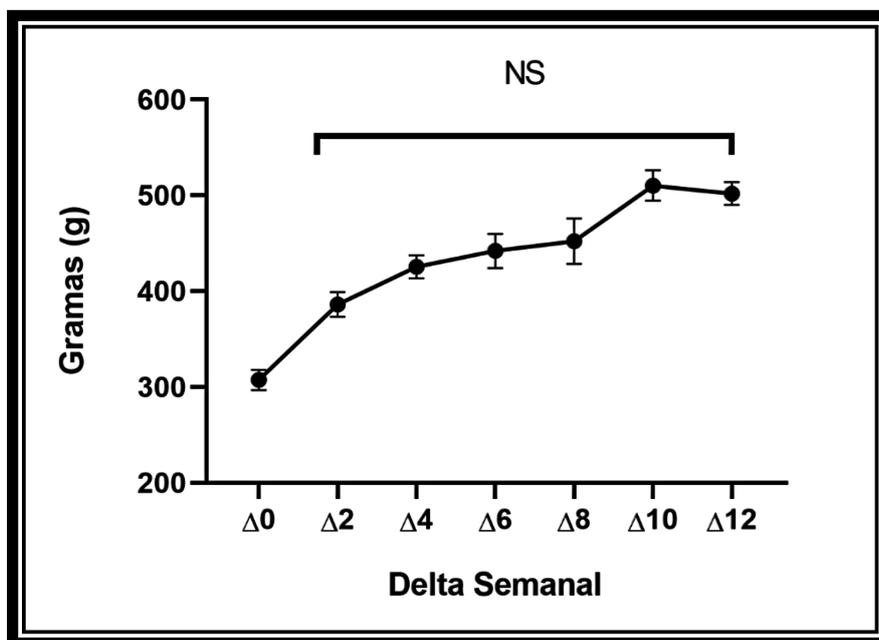


Figura 12- Representação gráfica do Peso Máximo Carregado do grupo TWD2

6.4 PESO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO ESQUERDO RELATIVO À 100G DO RATO

No peso da massa do gastrocnêmio relativo ao peso de 100g do animal, apresentou diferença significativa nos grupos W2 vs. TW2 ($p=0,0252$), W2 vs. TW6 ($p=0,0065$) e W6 vs. TW6 ($p= 0,0470$), onde a variável treinamento parece influenciar de forma vigorosa no aumento de peso do musculo, enquanto a variável de aplicação de decanoato de nandrolona não causou mudança significativa.

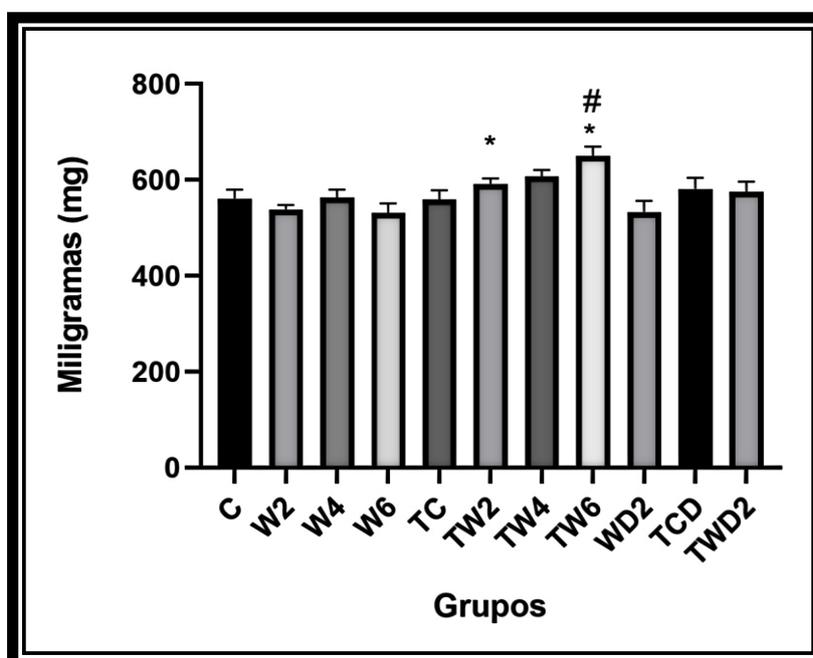


Figura 13- Representação gráfica do peso da massa total do musculo gastrocnêmio relativo a cada 100g do animal.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos) *= W2 vs. TW2 ($p=0,0252$), W2 vs. TW6 ($p=0,0065$) e #= W6 vs. TW6 ($p=0,0470$).

6.5 DIÂMETRO HISTOLÓGICO DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO ESQUERDO

Os grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao diâmetro do gastrocnêmio esquerdo, como mostra a figura 14.

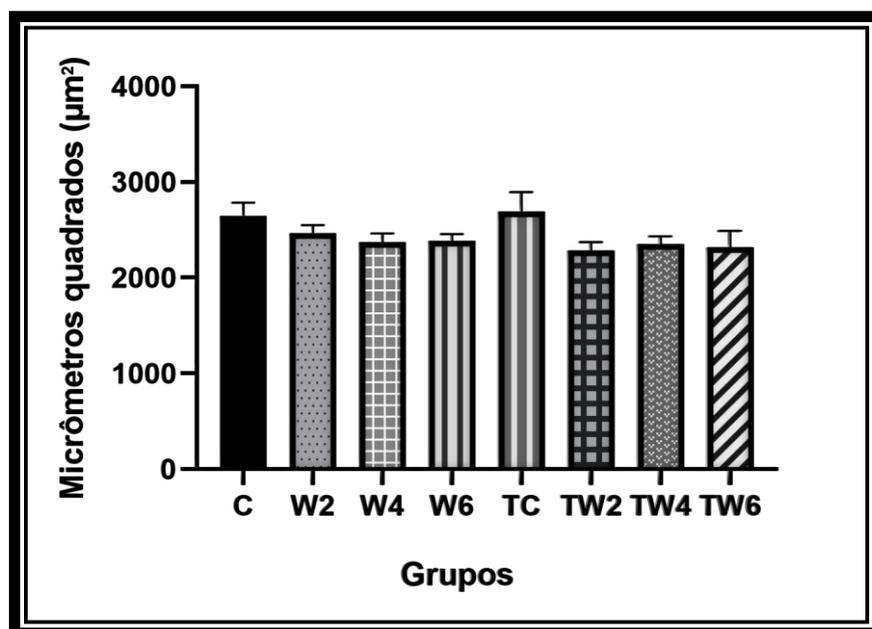


Figura 14- Representação gráfica do diâmetro histológico do musculo gastrocnêmio esquerdo.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1; WD2 = Sedentário+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana; TCD = Treinado + 0,5 mg·kg·semana; TWD2 = Treinado+2g·kg·dia-1 + 0,5 mg·kg·semana. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos) não apresentou diferença significativa

6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE MTOR, MURF-1 E MAFBX DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO DIREITO

Na expressão gênica de MTOR os grupos W2 vs. TC ($p= 0,0176$), W4 vs. TC ($p= 0,0329$) e W6 vs. TC ($p= 0,0437$) apresentaram diferença significativa, mostrando grande influência do treinamento na expressão desse gene. Em relação a expressão de MURF-1 os C vs. W4 ($p= 0,0319$) e C vs. W6 ($p= 0,0160$), apresentaram diferença significativa, todavia os grupos suplementados apresentaram medias inferiores ao grupo controle. Diferente dos genes anteriores os a expressão de MAFBX não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos.

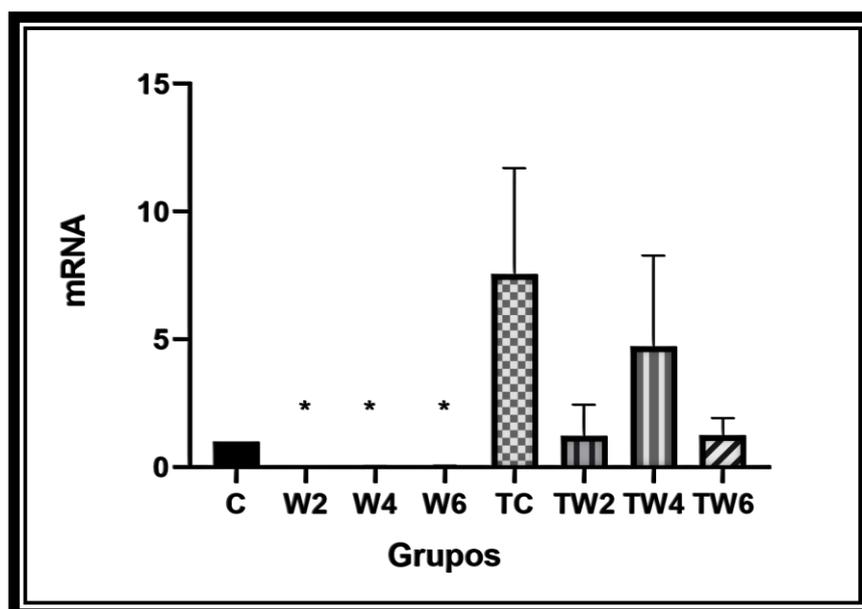


Figura 15- Representação gráfica expressão gênica de MTOR do musculo gastrocnêmio direito.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos)= W2 vs. TC ($p= 0,0176$), W4 vs. TC ($p= 0,0329$) e W6 vs. TC ($p= 0,0437$).

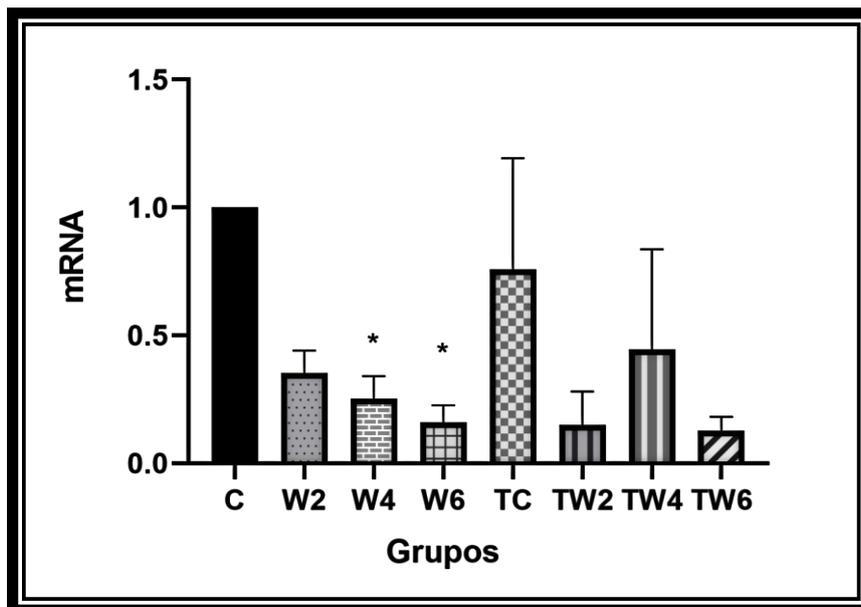


Figura 16- Representação gráfica expressão gênica de MURF-1 do musculo gastrocnêmio direito.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos)= C vs. W4 ($p= 0,0319$) e C vs. W6 ($p= 0,0160$).

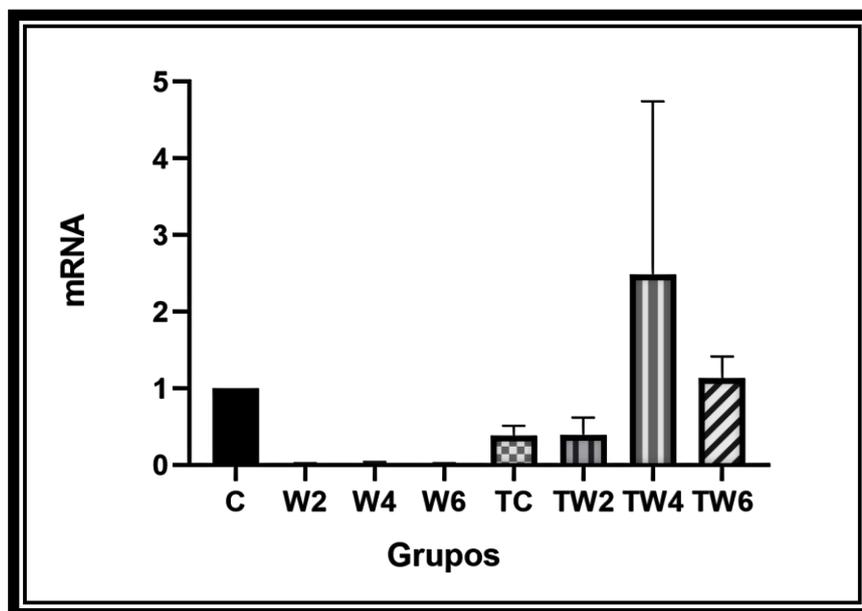


Figura 17- Representação gráfica expressão gênica de MAFBX do musculo gastrocnêmio direito.

C = Controle Sedentário não suplementado; W2 = Sedentário+2g·kg·dia-1; W4 = Sedentário+4g·kg·dia-1; W6 = Sedentário+6g·kg·dia-1; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado+2g·kg·dia-1; TW4 = Treinado+4g·kg·dia-1; TW6 = Treinado+6g·kg·dia-1. **ANOVA One-Way post hoc Tukey** (Intergrupos) não apresentou diferença significativa.

7 DISCUSSÃO

A massa corporal demonstrou diferença significativa na semana 0 entre os grupos C vs. TCD ($p=0,0209$), C vs. TWD2 ($p=0,0390$), W2 vs. W6 ($p= 0,0168$), W2 vs. WD2 ($p= 0,0044$), W2 vs. TCD ($p= 0,0009$), W2 vs. TWD2 ($p= 0,0025$), W6 vs. TW2 ($p=0,0115$), TW2 vs. WD2 ($p= 0,0032$), TW2 vs. TCD ($p=0,0007$), TW2 vs. TWD2 ($p= 0,0018$), TW4 vs. TCD ($p= 0,0263$), TW4 vs. TWD2 ($p= 0,0465$), TW6 vs. WD2 ($p= 0,0323$), TW6 vs. TCD ($p= 0,0098$), TW6 vs. TWD2 ($p= 0,0179$), mas apesar dos grupos WD2, TCD e TWD2 apresentarem diferença inicial aos demais grupos, o delta de ganho de massa total se manteve na mesma proporção aos demais grupos, não apresentando diferença no delta ao final das 12 semanas.

O consumo de Whey mostrou aumento dentro do esperado, pois está relacionado com o ganho de massa corporal total, com diferença significativa entre a semana 1 em relação a semana 12.

Em relação ao peso máximo carregado os grupos TC vs. TCD ($p= 0,0005$), TC vs. TWD2 ($p= 0,0478$), TW4 vs. TCD ($p<0,0001$), TW4 vs. TWD2 ($p=0,0046$), TW6 vs. TCD ($p= 0,0094$) apresentaram diferença significativa na semana 0 demonstra na figura 6, mas no $\Delta 2$ apresenta diferença somente no grupo TW6 vs. TCD ($p= 0,0238$), no $\Delta 4$ TC vs. TCD ($p= 0,0061$), TW2 vs. TW6 ($p=0,0499$) e $\Delta 8$ TW2 vs. TWD2 ($p=0,0367$), demonstrando uma progressão de aumento de força significativa em todos o grupos pelo protocolo de treinamento utilizado, mantendo esse delta de ganho uniforme ao decorrer do final do experimento.

A respeito do ganho de força no grupo relação ao último teste como demonstrado nas figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12 teve predominância significativa de

aumento até a semana 4 possivelmente pela adaptação neural ao treinamento, mas continuamente obtendo aumentos positivos a caminhar para o final do experimento.

O peso do músculo gastrocnêmio esquerdo relativo à 100g do animal apresentou diferença nos grupos W2 vs. TW2 ($p=0,0252$), W2 vs. TW6 ($p=0,0065$) e W6 vs. TW6 ($p= 0,0470$), a variável treinamento resistido parece ter contribuído positivamente no aumento da massa do músculo gastrocnêmio esquerdo nos grupos TW2 e TW6 em relação ao grupo W2 e W6 que recebeu somente suplementação de Whey Proteins.

Os dados obtidos (parciais) do diâmetro histológico do músculo gastrocnêmio esquerdo demonstraram não haver diferença significativa entre os grupos.

A expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX do músculo gastrocnêmio direito demonstrou diferença significativa na expressão de MTOR nos grupos W2 vs. TC ($p= 0,0176$), W4 vs. TC ($p= 0,0329$) e W6 vs. TC ($p= 0,0437$) corroborando o estudo de Zeng e colaboradores (2017) onde todos os grupos de treinamento tiveram maior expressão de MTOR em relação aos grupos sedentários.

O gene MURf-1 demonstrou redução nos grupos C vs. W4 ($p= 0,0319$) e C vs. W6 ($p= 0,0160$), apenas e MAFBX não apresentou diferença significativa entre os grupos. Apesar de não haver resultados similares na literatura, é importante apontar o estudo de Steiner e colaboradores (2016) que demonstrou a redução de MURf-1 e MAFBX em dois grupos (operação simulada e castrado) de forma aguda após uma única sessão de treinamento, isso demonstra a possibilidade desse resultado ocorrer durante as sessões de treinamento do experimento.

8 CONCLUSÃO

Os dados demonstram que o treinamento resistido aumentou a força e a massa corporal dos ratos quando associado a suplementação de whey proteins, Decanoato de Nandrolona e Treinamento Controle (TC), estudos futuros devem ser realizados com doses as acima das terapêuticas, para elucidar quais doses podem apresentar diferenças significativas em relação aos outros grupos não hormonizados.

9 FINANCIAMENTO

O presente estudo foi realizado com auxílio de uma bolsa de mestrado do programa de demanda social da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

ADEGOKE, O.A.J.; ABDULLAHI, A.; TAVAJOHI-FIN, P. Mtorc1 and the regulation of skeletal muscle anabolism and mass. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, v. 37, n. 3, p. 395-406, 2012.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, 2004

BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W.O.; STOVER, G.L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J.C.; GLASS, D.J.; YANCOPOULOS, G.D. Pathway is a Crucial Regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*. v. 3, n. 11, p.1014-1019. 2001.

BURD, N.A.; TANG, J.E.; MOORE, D.R.; PHILLIPS S.M. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol*, v. 5, n. 106, p. 1692-1701, 2009.

CAMERINO, G. M.; DESAPHY, J. F.; DE BELLIS, M.; CAPOGROSSO, R. F.; COZZOLI, A.; DINARDO, M. M; CALOIERO R.; MUSARAJ K.; A.FONZINO; CONTE E.; JAGERSCHMIDT C.; NAMOUR F.; LIANTONIO A.; DE LUCA A.; CAMERINO D. C.; PIERNO S. Effects of nandrolone in the counteraction of skeletal muscle atrophy in a mouse model of muscle disuse: molecular biology and functional evaluation. *PloS one*, v. 10, n. 6, p. e0129686, 2015

CAPUTO, L.F.G.; GIRITANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Técnicas histológicas. In MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Instituto Oswaldo Cruz. p. 89-188. 2010.

DRUMMOND, M.J.; DREYER, H.C.; PENNING, B.; FRY, C.S.; DHANANI, S.; DILLON, E.L.; SHEFFIELD-MOORE, M.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J appl physiol*, v. 104, n. 4, p. 1452–1461, 2008.

FLORINDO, A.A.; JÚNIOR, J.C.F.; BARROS, M.V.G.; HALLAL, P.C.; REIS, R.S. *Análise de dados em saúde*. 3ª edição. Jose Cazuza, 2012.

GRAHAM, M.R.; DAVIES B.; GRACE, F.M.; KICMAN A.; BAKER J.S. Anabolic steroid use patterns of use and detection of doping. *Sports med*, v. 38, n. 6, p. 505-525, 2018

GUERTIN, D.A.; SABATINI, D.M. Defining the Role of MTOR in Cancer. *Cancer Cell*. v. 12. n. 1. p.9-22. 2007.

HOURDE, C.; JAGERSCHMIDT, C.; CLÉMENT-LACROIX, P.; VIGNAUD, A.; AMMANN, P.; BUTLER-BROWNE, G.S.; FERRY, A. Androgen replacement therapy improves function in male rat muscles independently of hypertrophy and activation of the Akt/mTOR pathway. *Acta physiologica*, v. 195, n. 4, p. 471-482, 2009.

HORNBERGER, T.A.; FARRAR, R.P. Physiological hipertrophy of the FHL muscle folowing 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can. J. Appl. Physiol.* v. 29. n. 1. p. 16-31. 2004.

KERSEY, R.D.; ELLIOT, D. L.; GOLDBERG, L.; KANAYAMA, G.; LEONE, J.E.; PAVLOVICH, M.; POPE, H.G. National athletic trainers' association position statement: anabolic-androgenic steroids. *Journal of athletic training*, v. 5, n. 47, p. 567-588, 2012.

KRUG, A.L.O.; MACEDO, A.G.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.E.; SANTOS, C.F.; AMARAL, S.L. High-Intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. *Muscle & Nerve*. v. 53. p. 779-788. 2016.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. MTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*. v. 122. n. 20. p.3589-3594. 2009.

LITTLE, J.P.; PHILLIPS, S.M. Resistance exercise and nutrition to counteract muscle wasting. *appl. physiol. nutr. metab.* v. 34, n. 10, p. 817-828, 2009.

MACÊDO, M.R.C. Expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX em ratos wistar suplementados com Whey Proteins por doze semanas.1998. 125f. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Maranhão, São Luís.1998.

MACEDO, A.C.; KRUG, A.L.O.; HERRERA, N.A.; ZAGO, A.S.; RUSH, J.W.E.; AMARAL, S.L. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 143. p.357-364. 2014

MACINTOSH, B.R.; GARDINER, P.F.; MCCOMA, A.J. *Skeletal muscle: Form and Function*. United States: Human Kinetics, 2006. 423 p.

MATUSHIMA, C. Deca-Durabolin. Schering-Plough. <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12976572017&pIdAnexo=7731710>. Acessado em 12/06/2018.

MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. *Fisiologia do exercício: nutrição, energia e desempenho humano*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 1481 p.

MICHAELA, C.D.; PHILLIPS, S.M. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage Whey. *Journal of food science*, v. 80, p. 8-15, 2015.

MURTON, A.J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P.L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. v. 1782. n. 12. p.730-743. 2008.

NEVES, S.M.P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E.W. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. São Paulo: FCF-IQ/USP. 2013. 216p.

PACHECO, M.T.B.; BIGHETTI, É.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, JOÃO E.D.; ROSANELI, C.F.; SGARBIERI, V.C. Effects of a Whey protein concentrate and its peptides in the protection of ulcerative lesions at rat gastric mucosa. *Revista de nutrição, Campinas*. v. 19, n. 1, p. 47-55, 2006.

PAL, S.; RADAVELLI-BAGATINI, S. The effects of Whey protein on cardiometabolic risk factors. *Obesity Reviews*. v. 14. n. 4. p.324-343. 2012.

QIN, W.; PAN, J.; BAUMAN, W.A.; CARDOZO, C.P. Differential alterations in gene expression profiles contribute to time-dependent effects of nandrolone to prevent denervation atrophy. *BMC genomics*. v. 11, n. 1, p. 596, 2010.

ROM, O.; REZNICK, A.Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MURF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 98. p.218-230. 2016.

STEINER, J. L.; FUKUDA, D. H.; ROSSETTI, M. L.; HOFFMAN, J. R.; GORDON, B. S. Castration alters protein balance after high-frequency muscle contraction. *Journal of Applied Physiology*, v. 122, n. 2, p. 264-272, 2016.

SILVERTHORN, D.U. *Fisiologia humana: Uma Abordagem Integrada*. 7ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2017. 963 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO (SBCAL/COBEA), 2012. Disponível em: <<http://www.sbcal.org.br>>. Acessado em 01/11/2016

TANG, J.E.; MOORE, D.R.; KUJBIDA, G.W.; TARNOPOLSKY M.A.; PHILLIPS, S.M. Ingestion of Whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol*, v. 3, n. 107, p.987-992, 2009.

WANG, W.; DING, Z.; SOLARES, G. J.; CHOI, S. M.; WANG, B.; YOON, A.; FARRAR R. P.; IYER, J. L. Co-ingestion of carbohydrate and whey protein increases fasted rates of muscle protein synthesis immediately after resistance exercise in rats. *PLoS one*, v. 12, n. 3, p. e0173809, 2017.

WEST, D.W.; BURD N.A.; TANG J.E.; MOORE D.R.; STAPLES A.W.; HOLWERDA A.M.; BAKER S.K.; PHILLIPS S.M. Elevations in ostensibly anabolic hormones with resistance exercise enhance neither training-induced muscle hypertrophy nor strength of the elbow flexors. *J Appl Physiol*, v. 1, n.108, p. 60-67, 2010.

WILKINSON, S.B.; PHILLIPS S.M.; ATHERTON P.J.; PATEL R.; YARASHESKI K.E.; TARNOPOLSKY M.A.; RENNIE M.J. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J physiol*, v. 15, n. 586, p. 3701-3717, 2008.

WILKINSON, S.B.; TARNOPOLSKY, M.A.; MACDONALD, M.J.; MACDONALD J.R.; ARMSTRONG D.; PHILLIPS S.M. Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. *Am J Clin Nutr.* v. 4, n. 85, p. 1031-1040, 2007.

WHITE, J. P.; GAO, S.; PUPPA, M. J.; SATO, S.; WELLE, S. L.; CARSON, J. A. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 365, n. 2, p. 174-186, 2013.

VELOSO, D.F.M.; PETROIANU, A.; FIGUEIREDO, J.A.; RODRIGUES, F.H.O.C.; CARNEIRO, B.G.M.C.E; CARDOSO, P.O. Efeito da orquiectomia na capacidade física de ratos. *Revista Einstein*, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 413-415, 2008.

XIA, Z.; CHOLEWA, J.; ZHAO, Y.; YANG, Y.Q.; SHANG, H.Y.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; NAIMO, M.A.; SU, Q.S.; ZANCHI, N.E. Hypertrophy-Promoting Effects of Leucine Supplementation and Moderate Intensity Aerobic Exercise in Pre-Senescent Mice. *Nutrients*. v. 8. n. 5. p.246-262. 2016.

ZHAO, J.; ZHANG, Y.; ZHAO W.; WU; Y., PAN; J.; BAUMAN; W. A.; CARDOZO, C. Effects of nandrolone on denervation atrophy depend upon time after nerve transection. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, v. 37, n. 1, p. 42-49, 2008.

ZENG, F.; ZHAO, H.; LIAO, J. Androgen interacts with exercise through the mTOR pathway to induce skeletal muscle hypertrophy. *Biology of sport*, v. 34, n. 4, p. 313, 2017.

APÊNDICE

ANEXOS