

Suplemento com *Cystoseira canariensis* promove aumento de resistência à carga máxima em músculo gastrocnêmio de ratas

Supplement with Cystoseira canariensis promotes an increase of resistance to the maximum load in the gastrocnemius muscle of female rats

Suplemento con Cystoseira canariensis promueve aumento de la resistencia a la carga máxima en músculo gastrocnemio de ratas

Douglas Reis Abdalla¹, Eliana Silva Cassimiro Araújo², Leonardo César Carvalho³, Dernival Bertoncello⁴

RESUMO | O objetivo deste trabalho foi avaliar a carga máxima suportada pelo músculo gastrocnêmio de ratas após intervenção com *Cystoseira canariensis*, associado ou não à natação. Foram utilizadas 28 ratas *Wistar*, divididas em 4 grupos: controle (C, n=7); suplemento (S, n=7); suplemento e natação (SN, n=7); e natação (N, n=7). Cada animal pertencente aos grupos S e SN recebeu 20 mg de inibidor de miostatina por dia. A natação consistiu em um protocolo aeróbio, três vezes por semana, durante oito semanas. Após o período de treinamento, foi retirado o músculo gastrocnêmio direito de cada animal e realizado teste de tração em uma máquina de ensaio Emic. Os resultados (Média±DP) foram avaliados por meio de ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). Houve diferença significativa para carga no limite máximo (em N) entre os grupos C (35,41±1,06) e S (39,98±1,15); N (27,94±2,19) e S (39,98±1,15); N (27,94±2,19) e SN (37,78±1,28). Em relação ao alongamento no limite máximo (em x10⁻³ m), o grupo SN obteve valor (20,68±1,19) significativamente maior do que os grupos C (17,15±1,11) e N (16,11±1,60). Houve diferença significativa para ganho de massa corporal entre os grupos tratados com suplemento e suplemento associado à natação, com menores valores para este último. O inibidor de miostatina, associado ou não à natação, promove aumento de resistência à carga máxima, no teste de tração, em músculo gastrocnêmio de ratas jovens.

Descritores | Miostatina; Natação; Força Muscular; Ratos Wistar.

ABSTRACT | Was evaluated the maximum load supported by the gastrocnemius muscle of female rats after the ministering of *Cystoseira canariensis*, either associated or not to swimming. Twenty-eight young Wistar female rats were used, divided into 4 groups: control (C, n=7); supplement (S, n=7); supplement and swimming (SSw, n=7); swimming (Sw, n=7). Each one pertaining to the groups S and SSw received 20 mg of myostatin inhibitor per day. The swimming consisted in an aerobe protocol, three times in a week, during eight weeks. The right gastrocnemius muscle of each animal was removed and a tension test was performed in an Emic testing machine. The results (Mean±SEM) were evaluated through ANOVA and Tukey test (p<0.05). A significant difference for maximum load (in N) was verified among the groups C (35.41±1.06) and S (39.98±1.15); Sw (27.94±2.19) and S (39.98±1.15); Sw (27.94±2.19) and SSw (37.78±1.28). In relation to the stretching at the maximum limit (in x10⁻³ m) at the maximum load, the group SSw obtained a value (20.68±1.19) significantly greater than the groups C (17.15±1.11), S and Sw (16.11±1.60). There was a significant difference for body weight gain among the groups treated with supplement and supplement associated to the swimming, with smaller values for this last. The myostatin inhibitor either, associated or not to the swimming, promotes

Estudo desenvolvido no Laboratório de Bioengenharia da Universidade de Uberaba (UNIUBE) – Uberaba (MG), Brasil.

¹Faculdade de Talentos Humanos (FACTHUS) – Uberaba (MG), Brasil.

²Universidade de Uberaba (UNIUBE) – Uberaba (MG), Brasil.

³Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) – Alfenas (MG), Brasil.

⁴Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) – Uberaba (MG), Brasil.

Endereço para correspondência: Dernival Bertoncello – Departamento de Fisioterapia Aplicada – Rua Capitão Domingos, 309 – Abadia – CEP: 38025-010 – Uberaba (MG), Brasil – E-mail:bertoncello@fisioterapia.uftm.edu.br

Apresentação: ago. 2013 – Aceito para publicação: abr. 2014 – Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Programa de Apoio a Pesquisa (PAPE) da UNIUBE – Conflito de interesses: nada a declarar – Parecer de aprovação no Comitê de Ética nº 028/2009.

an increase of resistance to the maximum load in the tension test in gastrocnemius muscle of young female rats.

Keywords | Myostatin; Swimming; Muscle Strength; Rats, Wistar.

RESUMEN | El objetivo de este trabajo fue evaluar la carga máxima soportada por el músculo gastrocnemio de ratas después de intervención con *Cystoseira canariensis*, asociado o no con la natación. Se utilizaron 28 ratas Wistar, divididas en 4 grupos: control (C, n=7); suplemento (S, n=7); suplemento y natación (SN, n=7); y natación (N, n=7). Cada animal perteneciente a los grupos S y SN recibió 20 mg de inhibidor de miostatina por día. La natación consistió en un protocolo aeróbico, tres veces por semana, durante ocho semanas. Tras el período de entrenamiento, fue retirado el músculo gastrocnemio derecho de cada animal y realizado test de tracción en una máquina

de ensayo Emic. Los resultados (Media±DP) fueron evaluados por ANOVA y test de Tukey (p<0,05). Hubo una diferencia significativa en la carga máxima (en N) entre los grupos C (35,41±1,06) y S (39,98±1,15); N (27,94±2,19) y S (39,98±1,15); N (27,94±2,19) y SN (37,78±1,28). En cuanto al alargamiento en el límite máximo (en x10⁻³ m), el grupo SN obtuvo valor (20,68±1,19) significativamente mayor que los grupos C (17,15±1,11) y N (16,11±1,60). Hubo una diferencia significativa en el aumento de masa corporal entre los grupos tratados con suplemento y suplemento asociado con la natación, con valores más bajos para este último. El inhibidor de miostatina, asociado o no con la natación, promueve aumento de resistencia a la carga máxima, en el test de tracción, en músculo gastrocnemio de ratas jóvenes.

Palabras clave | Miostatina; Natación; Fuerza Muscular; Ratas Wistar.

INTRODUÇÃO

A hipertrofia do músculo esquelético é resultado do crescimento individual da área transversal das fibras musculares, o que resulta em um aumento de sua área de secção transversa, que, por sua vez, é reflexo do acréscimo no número e tamanho das miofibrilas e a adaptação de sarcômeros no interior da fibra muscular¹. Dentre os mecanismos responsáveis pelo controle do aumento do tamanho da fibra muscular, há de se considerar a miostatina, um potente regulador de crescimento e diferenciação mioblástica².

Esta proteína, miostatina, é expressa inicialmente durante a formação da célula musculoesquelética e conhecida como fator diferenciador de crescimento -8 (GDF-8), da superfamília de fator de crescimento tumoral beta (TGF-β). Trata-se de um inibidor do aumento do trofismo muscular, pela inativação dos mioblastos e de células satélites³⁻⁶.

No músculo esquelético, a miostatina é transcrita como um RNA mensageiro (RNAm) que codifica uma proteína precursora contendo 335 aminoácidos. Em camundongos adultos, a miostatina circula como uma forma latente no sangue que pode ser ativada em meio ácido, similar ao TGF-β. A expressão excessiva de miostatina sistêmica em ratas adultas induz a perda de massa muscular profunda e de gordura sem, no entanto, diminuir a absorção de nutrientes⁷. Ainda, já foi identificada a diminuição da expressão de RNAm para miostatina em músculo esquelético de camundongos expostos ao treinamento físico⁸.

Na literatura há poucos indicativos de inibidores de miostatina, embora já tenham sido considerados como prováveis candidatos à terapia gênica⁹⁻¹¹.

Estudos sugerem que a suplementação que contém *Cystoseira canariensis* pode promover perda de massa gorda corporal e ganho de massa muscular, uma vez que esse composto, derivado de algas marrons, seria ligado à miostatina e, aparentemente, reduziria os efeitos biológicos desta proteína¹²⁻¹⁴. No entanto, não são encontrados estudos que abordem o efeito dessa suplementação sobre a resistência e força muscular em ratos. Sua importância para o controle de massa muscular vem ao encontro da necessidade de se desenvolver estudos com foco em situações de perda de força, seja por desuso ou por ausência de filamentos proteicos no interior das miofibrilas, seja em decorrência de alguma doença específica, síndromes ou envelhecimento^{15,16}.

O objetivo deste trabalho foi verificar o possível efeito do suplemento com *Cystoseira canariensis*, associado ou não à natação, sobre a massa corporal e a força de tração do músculo gastrocnêmio de ratas.

METODOLOGIA

Animais

Este estudo caracterizou-se como experimental randomizado. Foram utilizadas 28 ratas *Wistar* com 45 dias de idade e massa corporal de aproximadamente 250 g, provenientes e mantidas no Biotério Central da UNIUBE. Os animais foram mantidos em regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controladas (25°C). Foram divididos em quatro grupos: controle (C, n=7), sem natação e sem suplemento; suplemento (S, n=7), que receberam suplemento; suplemento associado à natação

(SN, n=7), que realizaram o protocolo de exercícios e receberam suplemento no período; e natação (N, n=7), que só realizaram o protocolo de natação.

Para realização do trabalho, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa institucional, foram seguidos todos os princípios propostos por alguns autores e ratificados pela UNESCO, que, em 1978, elaborou a Declaração dos Direitos dos Animais. O experimento norteou-se de acordo com todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento de cada animal^{17,18}. O projeto foi aprovado pela Comissão de Experimentação Animal da UNIUBE (Processo nº 028/2009).

Tratamento e protocolo de exercícios

Os animais dos grupos S e SN foram tratados com 20 mg de suplemento Myoblast™, que contém *Cystoseira canariensis*, diluído em água, em uma dose diária, durante 8 semanas, 6 dias por semana.

Os animais foram treinados com exercício aeróbio crônico moderado (natação), em uma frequência de três vezes por semana, em dias alternados, durante oito semanas, a partir de protocolo adaptado de diferentes autores^{19,20}. A temperatura da água foi mantida entre 30° e 35°C e trocada diariamente. Durante o período de natação, o aumento do tempo foi progressivo, iniciando, no primeiro dia, com 15 minutos, com acréscimo de 15 minutos no segundo dia e assim sucessivamente, até chegar ao tempo total de 45 minutos. Durante a natação, realizada em tanque com dimensões de 1,5x0,90x0,70 m, o animal teve sobrecarga (5% da massa corporal) atada à cauda.

Variáveis estudadas

Massa Corporal

No decorrer das oito semanas de tratamento, foram verificados, semanalmente, os valores de massa corporal dos animais, a fim de preparar a carga a ser atada à cauda e avaliar o provável ganho de peso. Após as oito semanas, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico.

Análise de tecido muscular

Ensaio de tração

Para o ensaio de tração foi coletado o conjunto fêmur-gastrocnêmio-calcâneo direito das ratas. A máquina

universal de ensaio EMIC® - modelo DL3500, do Laboratório de Pesquisa em Materiais Odontológicos da Universidade de Uberaba, equipada com uma célula de carga 50 kgf, foi utilizada para execução do ensaio mecânico. A máquina esteve ligada diretamente a um microcomputador equipado com *software* capaz de obter os valores de carga e alongamento com precisão. Foi utilizado um acessório especial para fixação e realização dos ensaios de tração dos músculos, para que fossem preservadas a origem e a inserção muscular.

Os parâmetros adotados para o ensaio foram: pré-carga de 0,30 kgf; velocidade do ensaio de 10 mm/min; limites de carga e alongamento de 8,00 kgf e 25 mm, respectivamente. Após a realização de cada ensaio foi observado o local de rompimento das fibras musculares. Para cada aumento de carga aplicado ao músculo foi obtido um valor resultante de alongamento, o que possibilitou a construção dos gráficos carga *versus* alongamento, por meio do programa *Microsoft Excel XP Professional*®.

Em seguida, foram analisadas as seguintes propriedades mecânicas: a carga no limite máximo; o alongamento no limite máximo; e a rigidez²¹⁻²⁴.

Análise estatística

Para a análise simultânea dos grupos foi utilizado o teste ANOVA e para comparação entre os grupos foi utilizado o teste Tukey-Kramer, sendo adotado, para ambos, um nível de significância menor de 5%.

RESULTADOS

Verificou-se que houve diferença significativa para ganho de massa corporal entre os grupos tratados com suplemento e suplemento associado à natação, com menores valores para este último (Tabela 1).

Tabela 1. Ganho de massa corporal (g), carga no limite máximo (N), alongamento no limite máximo ($\times 10^{-3}$ m) e rigidez ($\times 10^3$ N/m) dos grupos (C), (S), (N) e (SN) (média±DP)

Grupo	Ganho de massa	Carga no limite máximo	Alongamento no limite máximo	Rigidez
C	67,5±15,01	35,41±1,06	17,15±1,11	3,07±0,31
S	92,3±18,04*	39,98±1,15*	18,71±2,31	3,22±0,28**
N	64,0±11,11***	27,94±2,19	16,11±1,60	2,06±0,29
SN	59,7±25,02	37,78±1,28****	20,68±1,19*****	2,83±0,63

*p<0,05 versus C (Controle); **p<0,05 versus N (Natação); ***p<0,05 versus SN (Suplemento e Natação); ****p<0,05 versus N; *****p<0,05 versus C e N

Verificam-se também, conforme Tabela 1, os valores referentes à carga no limite máximo (CLM) e ao alongamento no limite máximo (ALM) apresentados pelo músculo gastrocnêmio dos animais. Ao final do período experimental, verificou-se que houve maiores valores de CLM para o grupo SN, comparado ao grupo N. Em relação ao ALM, o grupo SN apresentou valor maior do que os grupos experimentais C, S e N. O valor de rigidez foi significativamente menor para o grupo que somente realizou natação, comparado ao grupo que somente recebeu suplemento. Não foram encontradas, para esta propriedade, diferenças significativas entre os demais grupos.

DISCUSSÃO

Objetivou-se, com este estudo, verificar a possível variação na massa corporal e no ganho de resistência do músculo gastrocnêmio de ratas ao teste de tração, após período de treinamento físico com ou sem suplemento contendo inibidor de miostatina. Embora a literatura apresente relevantes trabalhos relacionados à terapia gênica e à terapêutica para aumento de massa muscular^{11,25}, não foi verificado trabalho identificando variação de massa corporal em animais tratados com inibidor de miostatina. Ressalta-se que o protocolo de exercícios utilizados foi do tipo aeróbio, o que já favoreceria a perda de massa corporal. O inibidor de miostatina parece mesmo ter efeito anabólico aos animais, o que teria tido ação acentuada quando não associada a qualquer terapêutica.

O inibidor de miostatina utilizado neste trabalho continha *Cystoseira canariensis*, um polissacarídeo derivado de algas marinhas marrons que possui um complexo grupo de macromoléculas, o que facilitaria sua ligação à miostatina e, conseqüentemente, a inativação dessa proteína. Também há registro de que esses polissacarídeos regulam alguns fatores de crescimento e citocinas, tais como os fatores de crescimento de fibroblasto, interferon e algumas enzimas pertencentes à família do TGF- β ^{12,26}.

Em estudo realizado em humanos por Willoughby¹³, que utilizou suplementos contendo *Cystoseira canariensis* combinados com exercícios físicos, não se verificou aumento na força e na massa muscular, quando comparados com o grupo que realizou treinamento sem suplementação. A quantidade utilizada no presente estudo poderia ter sido suficiente para gerar tais alterações nas

ratas, ao contrário do trabalho citado, visto ser o mesmo mecanismo de atuação para crescimento do músculo esquelético tanto em humanos quanto nesses animais.

A implicação deste estudo pode ser estendida aos casos em que há necessidade de manutenção da massa muscular em determinadas doenças específicas que culminam em perda de força²⁷⁻²⁹. Bogdanovich *et al.*³⁰ testaram a inibição da miostatina *in vivo* em camundongos mdx e os resultados revelaram aumento de peso, massa, tamanho e força muscular absoluta, com uma diminuição significativa na degeneração muscular. Concluíram que o bloqueio da miostatina oferece tratamento de doenças associadas à perda muscular, como, por exemplo, a distrofia muscular de Duchenne. A expressão do gene GDF-8 é similar em tecidos musculares de pacientes portadores de dois tipos de distrofia muscular (Duchenne e Becker) com diferentes graus de comprometimento clínico³¹.

Em estudo recente, houve a aplicação de protocolo de natação (45 minutos, 2 vezes ao dia, durante 4 semanas) a ratos submetidos ou não a uma dieta com alto teor de gordura. Os animais que realizaram natação e não tiveram dieta especial apresentaram significativa redução na expressão de RNAm para miostatina no músculo gastrocnêmio analisado, comparados ao grupo que não fez exercícios; mas o resultado não se repetiu quando foram comparados os grupos que receberam dieta rica em gordura³². O protocolo de natação utilizado neste estudo pode ter sido potencializado pelo uso do suplemento com *Cystoseira canariensis*.

Os presentes achados indicam maior carga máxima suportada pelos músculos de ratas que receberam suplementação, seja comparada ao grupo C ou ao grupo N. Para o grupo S, pode ser que o ganho de massa tenha contribuído também para o aumento da resistência ao teste de tração realizado. No entanto, o grupo que realizou natação e recebeu suplemento e natação teve menor ganho de massa corporal, mas apresentou resistência à carga máxima quando comparado ao grupo N e não diferiu do C.

Em relação ao alongamento no limite máximo, os grupos que receberam suplemento (isolado ou associado à natação) foram os que apresentaram maiores valores. Quando se verifica o maior alongamento do músculo adiante da carga no limite máximo, denota-se sua maior rigidez, valor reflexo da fase elástica do músculo, o que ocorreu com o grupo que recebeu somente suplemento. Este resultado é um indicativo positivo da ação do *Cystoseira canariensis* sobre o músculo, uma vez que também foram observados maiores valores para a

carga no limite máximo nesses músculos, deixando-o mais resistente à lesão e ou ruptura, resistência esta que, em outras circunstâncias de análise, já foi verificada por alguns autores e indica ser o ensaio de tração uma forma de análise para preservar as características fisiológicas do músculo^{24,33,34}.

O fato de o músculo gastrocnêmio dos animais que receberam *Cystoseira canariensis* apresentar melhores resultados para as propriedades mecânicas estudadas indica possivelmente modificação na estrutura do músculo gastrocnêmio das ratas, o que não foi possível confirmar pela falta de análise histológica, uma limitação deste estudo. No entanto, a suplementação mostrou-se eficaz durante essas oito semanas de tratamento no que se refere ao desempenho do músculo diante da imposição de carga de tração.

CONCLUSÃO

O suplemento contendo inibidor de miostatina parece exercer efeito anabólico aos músculos dos animais, inclusive na contribuição para o ganho de massa corporal. Ainda, associado ou não à natação, promove aumento de resistência à carga máxima, no teste de tração, em músculo gastrocnêmio de ratas jovens, o que se torna um indicativo positivo para a melhora do desempenho muscular.

REFERÊNCIAS

- Meloni VHM. O papel da hiperplasia na hipertrofia do músculo esquelético. *Rev Bras Cine Des Hum*. 2005;7(1):59-63.
- Yamada AK, Verlengia R, Bueno Junior CR. Myostatin: genetic variants, therapy and gene doping. *Braz J Pharm Sci*. 2012;48(3):369-77.
- 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.
- 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.
- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(1):E157-E64.
- Lee SJ, Huynh TV, Lee YS, Sebald SM, Wilcox-Adelman SA, Iwamori N, et al. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):E2353-60.
- Hamrick MW, McPherron AC, Lovejoy CO. Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(1):63-8.
- Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello R, et al. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. *Exp Physiol*. 2006;91(6):983-94.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2682-8.
- Artioli GG, Hirata RDC, Lancha Junior AH. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13(5):349-54.
- Candena SM, Tomkinson KN, Monnell TE, Spaits MS, Kumar R, Underwood KW, et al. Administration of a soluble activin type II B receptor promotes skeletal muscle growth independent of fiber type. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(3):635-42.
- Ramazanov Z, Jimenez del Rio M, Ziegenfuss T. Sulfated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 2003;27(2-3):101-6.
- Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(4):574-82.
- Williams M. Dietary Supplements and Sports Performance: Herbals. *JISSN. J Int Soc Sports Nutr*. 2006;3(1):1-6.
- Krivickas LS, Walsh R, Amato AA. Single muscle fiber contractile properties in adults with muscular dystrophy treated with MYO-029. *Muscle Nerve*. 2009;39(1):2-9.
- LeBrasseur NK, Schelhorn TM, Bernardo BL, Cosgrove PG, Loria PM, Brown TA. Myostatin inhibition enhances the effect of exercise on performance and metabolic outcomes in aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009;64(9):940-8.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen;1959.
- Zimmermann M. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.
- Takeda N, Ohkubo T, Nakamura I, Suzuki H, Nagano M. Mechanical catecholamine responsiveness and myosin isoenzyme pattern of pressure-overloaded rat ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol*. 1987;82(4):370-4.
- Pestana PRD, Alves AN, Fernandes KPS, Silva Junior JA, França CR, Martins MD, et al. Efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do musculo esquelético de rato. *Rev Bras Med Esporte*. 2012;18(6):419-22.
- Matheus JPC, Milani JGPO, Gomide LB, Volpon JB, Shimano AC. Análise biomecânica dos efeitos da crioterapia no tratamento da lesão muscular aguda. *Rev Bras Med Esporte*. 2008;14(4):372-5.
- Carvalho LC, Polizello JC, Padula N, Freitas FC, Shimano AC, Mattiello-Sverzut AC. Propriedades mecânicas do gastrocnêmio eletroestimulado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras*. 2009;17(5):269-72.
- Abdalla D, Bertonecello D, Carvalho LC. Avaliação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizado e submetido à corrente russa. *Fisioter Pesq*. 2009;16(1):59-64.
- Kodama FY, Camargo RCT, Job AE, Osaki GAT, Koike TE, Camargo Filho JCS. Propriedades mecânicas do músculo de ratos adultos e idosos, exercitado pós-imobilização. *Acta Ortop Bras*. 2012;20(4):218-22.
- Oliveira RS, Collares TS, Smith KR, Collares TV, Seixas FK. The use of genes for performance enhancement: doping or therapy? *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(12):1194-201.

26. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(16):9306-1.
27. Sumner CJ, Wee CD, Warsing LC, Choe DW, Ng AS, Lutz C, *et al*. Inhibition of myostatin does not ameliorate disease features of severe spinal muscular atrophy mice. *Hum Mol Gen*. 2009;18(17):3145-52.
28. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J*. 2005;19(6):543-54.
29. Qiao C, Li J, Jiang J, Zhu X, Wang B, Li J, *et al*. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum Gen Ther*. 2008;19(3):241-54.
30. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Khurana TS. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: Current approaches and futures directions. *J Mol Med (Berl)*. 2004;82(2):102-15.
31. Costa CS. Estudo da expressão do gene GDF-8 em tecido muscular de camundongos distróficos mdx e nas distrofias Xp21 humanas [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2002. 79p.
32. Bueno PG, Bassi D, Contrera DG, Carnielli HM, Silva RN, Nonaka KO, *et al*. Post-exercise changes in myostatin and actRIIB expression in obese insulin-resistant rats. *Mol Cell Endocrin*. 2001;339(1-2):159-64.
33. Järvinen M, Einola SA, Virtanen EO. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehabil*. 1992;73(3):253-7.
34. Carvalho LC, Shimano AC, Picado CHF. Estimulação elétrica neuromuscular e o alongamento passivo manual na recuperação das propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio imobilizado. *Acta Ortop Bras*. 2008;16(3):161-4.