

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Mestrado de Patologia Experimental**

**Alteração das fibras musculares
esqueléticas com o exercício aeróbio**

**Lúcia Pedro Simões
Coimbra, 2009**

Alteração das fibras musculares esqueléticas com o exercício aeróbio

Mestrado de Patologia Experimental

Orientador:

Professora Doutora Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares

Co-orientador:

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra para prestação
de provas de Mestrado em Patologia Experimental

Agradecimentos

À Senhora Professora Doutora Paula Cristina Vaz Bernardo Tavares, orientadora desta dissertação, pela disponibilidade e ensinamentos que prestou na realização deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita, co-orientador deste trabalho, pelo apoio e sugestões prestados.

Ao Senhor Professor Fontes Ribeiro, pela disponibilidade prestada.

Ao colega de trabalho João, pela ajuda no treino dos animais e pelo companheirismo.

À Sandra Simões, técnica do laboratório de neuropatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela ajuda e colaboração no projecto.

Às Sras. D. Margarida Menezes e Elisa Patrocínio técnicas do Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra pelo apoio e colaboração no projecto.

À minha amiga Lurdes pela ajuda e pelo apoio moral.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo deste tempo da realização da tese e que sempre me apoiaram.

Aos meus pais pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

Resumo

Neste trabalho procurámos averiguar as alterações que ocorrem nas fibras musculares esqueléticas, com o exercício aeróbio, através da verificação do tipo de fibras I e II. E também verificar a expressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), nas suas diferentes isoformas, as constitutivas (nNOS e eNOS) e a indutiva (iNOS). Procurámos estabelecer uma relação entre estas duas ocorrências para tentar perceber melhor os mecanismos de funcionamento do músculo esquelético com o exercício aeróbio e assim tentar arranjar novos tratamentos para casos em que haja necessidade de imobilização.

Para verificar o tipo de fibras e a expressão das enzimas NOS, utilizámos dois grupos de ratos Wistar num protocolo de treino de oito semanas. O primeiro grupo, o grupo controlo, fez apenas uma caminhada de cinco minutos por semana durante oito semanas, para se ambientar ao tapete rolante e assim podermos excluir possíveis alterações moleculares induzidas pelo stress do tapete rolante a nível psico-motor. O segundo grupo, o grupo exercitado, foi sujeito a um protocolo de treino de cinco dias por semana durante oito semanas, em que o tempo de corrida e a velocidade foram aumentando progressivamente até atingir, na quarta semana, cerca de uma hora por dia a uma velocidade máxima de 54cm/s e inclinação do tapete de 15°.

Verificámos que o protocolo de treino foi efectivo uma vez que observámos alterações morfológicas das fibras musculares, verificámos um aumento na percentagem relativa das fibras do tipo I no músculo soleus.

Relativamente à expressão das isoformas da enzima NOS também houve um aumento da sua expressão no músculo soleus dos ratos exercitados. No músculo gastrocnemius em que não houve alteração do tipo de fibras musculares, também o aumento da expressão das isoformas da enzima NOS não foi significativo.

Podemos assim concluir que o aumento das fibras musculares esqueléticas do tipo I se verifica em paralelo com o aumento da NOS, e que a NOS é um sinalizador importante no mecanismo da adaptação das fibras musculares com o exercício aeróbio.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 O estado da arte	1
1.1.1 O Tecido Muscular	1
1.1.2 Tecido Muscular Estriado Esquelético	2
1.1.3 Fibras musculares esqueléticas	3
1.1.4 Mecanismo da contracção muscular	7
1.1.5 Sistema de produção de energia	8
1.1.6 Propriedades das fibras musculares	9
1.1.7 Alterações musculares	12
1.1.8 Regeneração	14
1.1.9 Efeito do exercício sobre o músculo esquelético	16
1.1.10 O óxido nítrico (NO) e o seu papel no músculo esquelético	17
2. Objectivos	22
2.1 Objectivos Específicos	23
2.2 Hipóteses.....	23
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Animais e condições de experimentação.....	24
3.2 Programa de treino.....	25
3.3 Sacrifício dos animais.....	27
3.4 Colheita de músculos.....	27
3.5 Estudos histoenzimológicos.....	28
3.6 Expressão genética das isoformas da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS)	29
4. Resultados	31
4.1 Peso dos animais.....	31
4.2 Teste de velocidade máxima.....	32
4.3 Análise macroscópica dos músculos.....	33

4.4 Análise histoenzimológica.....	33
4.5 Análise histológica.....	36
4.5.1 Músculo soleus.....	36
4.5.2 Músculo gastrocnemius.....	38
4.6.1 Expressão da cNOS.....	39
4.6.2 Expressão da iNOS.....	40
5. Discussão	41
6. Conclusão	44
7. Bibliografia	45

Índice de figuras

- Figura 1-** Imagem representativa do músculo estriado esquelético ilustrando a sua organização..... 2
- Figura 2-** O músculo esquelético é composto por feixes de fibras musculares chamados fascículos. Cada fibra muscular representa uma célula muscular que contém miofibrilhas. As miofibrilhas por sua vez estão organizadas em sarcômeros. (Adaptado Junqueira e Carneiro, edição 10, 2004)..... 3
- Figura 3-** Representação esquemática do sarcômero. (Adaptado Junqueira e Carneiro, edição 10, 2004)..... 5
- Figura 4-** Efeito das baixas (derivadas da eNOS ou nNOS) ou altas (derivadas da iNOS) concentrações de NO (Adaptado de Schulz et al. 2004)19
- Figura 5-** Ratos Wistar utilizados durante o trabalho. Os animais foram mantidos em gaiolas de acordo com as orientações estabelecidas pela legislação em vigor..... 24
- Figura 6-** A figura mostra dois animais a serem exercitados no tapete rolante de acordo com o protocolo descrito nesta secção..... 25
- Figura 7-** Modelo esquemático dos músculos da pata traseira do rato. Os que vão ser estudados neste trabalho são: o gastrocnemius (10) e o soleus (12). Adaptado do livro **The laboratory mouse**..... 28
- Figura 8-** Exemplo das análises enzimáticas (ATPase) dos músculos gastrocnemius medialis (A) e soleus (B), onde se podem ver as fibras tipo I marcadas a branco e as fibras tipo II a castanho escuro.....34
- Figura 9-** Corte transversal de músculo esquelético de rato controlo. Pode ver-se o padrão normal das fibras musculares. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina-Eosina..... 37
- Figura 10-** Corte transversal do músculo soleus de ratos treinados durante oito semanas. Pode ver-se alguma fibrose intersticial, células com núcleo central, várias células de pequeno tamanho que sugerem células em formação. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina-Eosina. 37
- Figura 11-** Corte transversal do músculo gastrocnemius de ratos treinados durante oito semanas. Pode ver-se algumas células em necrose, várias células hipercontraídas. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina Eosina 38

Índice de tabelas

Tabela 1- Protocolo de exercício do grupo II (animais treinados durante oito semanas).....	26
---	-----------

Índice gráficos

Gráfico 1- pesos dos animais em estudo. Controlo (n=5)- grupo de animais sem treino; exercício (n=8)- animais sujeitos a exercício aeróbio durante oito semanas em tapete rolante (como descrito na secção de metodologia). Cada símbolo representa a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão.....	31
---	-----------

Gráfico 2- Tempo de duração do teste de velocidade/resistência, em minutos. As barras representam médias dos tempos realizados pelos animais controlo (n=5) e animais exercitados (n=8). As linhas verticais representam o erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo controlo.....	32
--	-----------

Gráfico 3- Velocidade máxima atingida (cm.s ⁻¹) durante o teste de velocidade/resistência. As barras representam médias e as linhas verticais o erro padrão das velocidades atingidas pelo grupo controlo (n=5) e pelo grupo exercitado (n=8). *p<0,05 relativamente ao grupo controlo.....	33
--	-----------

Gráfico 4- Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo soleus dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num mínimo de 500 fibras.....	35
---	-----------

Gráfico 5- Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo gastrocnemius lateralis dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num mínimo de 500 fibras.....	36
--	-----------

Gráfico 6- Densidade relativa (%) da expressão da cNOS nos dois músculos em estudo. *p<0,05 relativamente ao grupo controlo.....	39
---	-----------

Gráfico 7- Densidade relativa (%) da expressão da iNOS nos dois músculos em estudo. *p<0,05 relativamente ao grupo controlo.....	40
---	-----------

1-Introdução

O músculo esquelético é um dos tecidos que maior volume ocupa no corpo humano, tendo como função o movimento e a postura.

Durante longos períodos de hospitalização ou no sedentarismo, a imobilização prolongada dos membros inferiores leva não só à perda ou diminuição da função muscular, mas também à alteração da morfologia muscular, manifestada pela diminuição do tamanho da massa muscular e da redução do número e diâmetro das fibras musculares (Boonyarom e Inui, 2006; *Fitts et al.*, 1986).

Actualmente todos aqueles que praticam exercício e em particular os profissionais do desporto, beneficiam do conhecimento científico que se têm verificado no tecido muscular para melhorarem a sua capacidade física.

Nos últimos anos têm-se feito inúmeros avanços no conhecimento da fisiologia muscular. Durante muito tempo a comunidade científica que estudava a fisiologia do músculo, não reconhecia a este tecido a capacidade de regeneração, e afirmava que cada músculo tinha um tipo de fibras que seria sempre o mesmo ao longo da vida.

Hoje sabe-se que as fibras não só são regeneráveis, como também, vão sofrendo alterações a nível molecular. As fibras são capazes de alterar a sua estrutura molecular para se adaptarem a novas funções. No sentido de conhecer melhor estas alterações e em que condições é que elas ocorrem realizámos este estudo.

Para compreendermos melhor os objectivos e metodologias deste trabalho, faremos uma breve revisão bibliográfica que visa rever a fisiologia do músculo esquelético e o seu comportamento com o exercício físico.

1.1. Estado da Arte

1.1.1 O Tecido Muscular

Existem três tipos de tecido muscular: o esquelético, o cardíaco e o liso. O tecido muscular é constituído por células alongadas chamadas fibras musculares, especializadas na contração muscular. Em todos estes tipos de músculo, a energia proveniente da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) é transformada em energia mecânica (Junqueira e Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2004).

1.1.2 Tecido Muscular Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas muito longas (até 25 cm, alguns autores chegam a referir 30 cm) e multinucleadas, medindo de diâmetro 10 a 100 μm . Estas células são chamadas de **fibras musculares**, apresentam estriações transversais quando vistas em corte longitudinal ao microscópio (Berne *et al.*, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004).

Os músculos esqueléticos estão organizados em grupos de feixes que se encontram envolvidos por uma membrana de tecido conjuntivo chamada **epimísio** que separa os músculos uns dos outros. Do epimísio partem finos septos de tecido conjuntivo que dividem as fibras musculares em feixes ou fascículos, estes septos constituem o **perimísio** (Figura 1). É esta membrana que serve de via de passagem aos vasos sanguíneos e nervos (Berne *et al.*, 2004).

Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida pelo **endomísio** que é constituído por uma densa malha de fibras de colagénio com cerca de 60 a 120 nm de diâmetro. Algumas destas fibras do endomísio são contínuas com o perimísio. Esta membrana de tecido conjuntivo é que mantêm as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contracção gerada por cada fibra actue sobre o músculo inteiro (Jones *et al.*, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004).

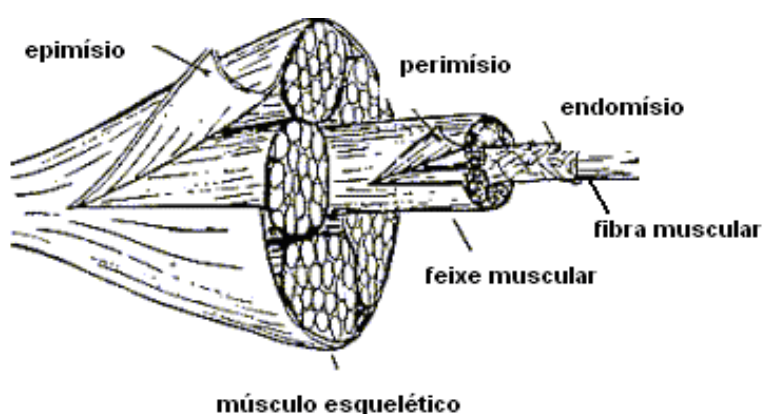


Figura 1- Imagem representativa do músculo estriado esquelético ilustrando a sua organização.

1.1.3 Fibras musculares esqueléticas

Cada fibra muscular esquelética, quando observada ao microscópio de luz em corte longitudinal, aparece com uma série de estriações claras e escuras alternadas, chamadas **banda I** e **banda A** respectivamente. As bandas A e I são assim chamadas devido às suas propriedades birrefringentes ao microscópio de polarização, a banda I é isotrópica e a banda A é anisotrópica, numa forma mais simples são chamadas de bandas claras (I) e bandas escuras (A) (Junqueira e Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2004).

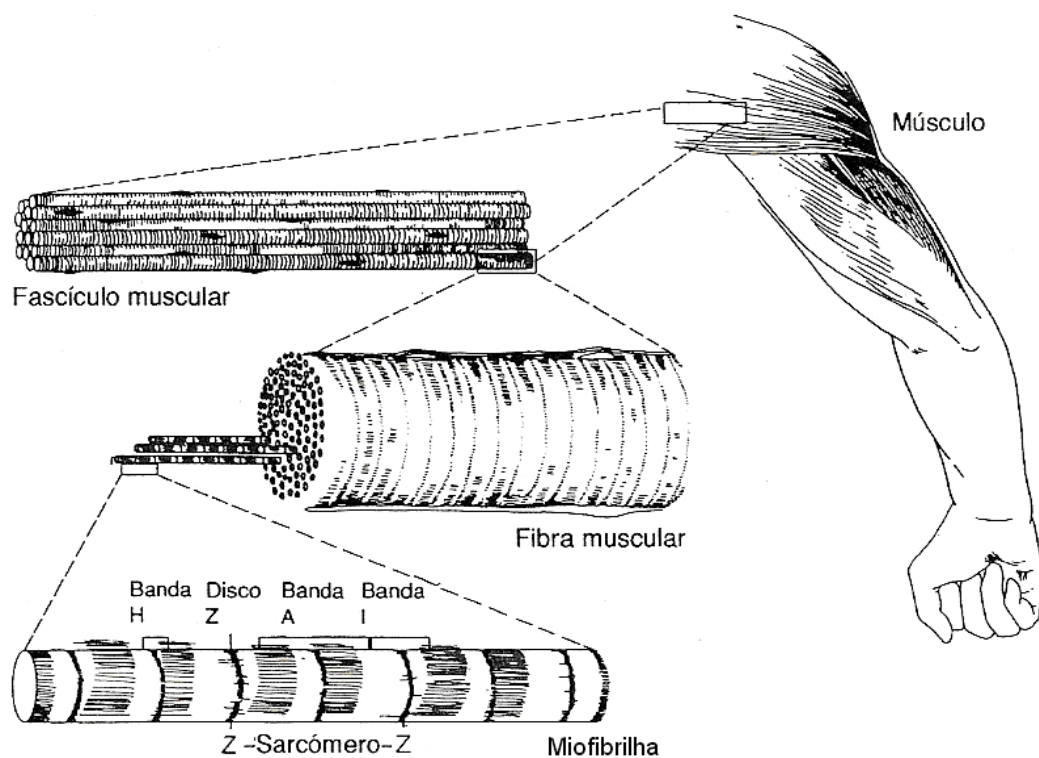


Figura 2- O músculo esquelético é composto por feixes de fibras musculares chamados fascículos. Cada fibra muscular representa uma célula muscular que contém miofibrilhas. As miofibrilhas por sua vez estão organizadas em sarcômeros. (Adaptado Junqueira e Carneiro, edição 10, 2004).

No interior da fibra muscular existem miofibrilhas contráteis que são constituídas por dois tipos principais de proteínas, a actina e a miosina, são filamentos dispostos regularmente que originam um padrão bem definido de estrias transversais alternadas,

claras e escuras. O conjunto de actina e miosina forma unidades que se repetem ao longo do comprimento das miofibrilhas e são denominadas **sarcómeros** (Figura 2). Os filamentos de actina e miosina podem ser observados em microscópio electrónico (Junqueira e Carneiro, 2004).

As faixas mais extremas do sarcómero são as mais claras e chamam-se **banda I**, contém apenas filamentos de actina. No extremo da banda I, os filamentos de actina ligam-se para formar uma linha que cora mais intensamente denominada **linha Z**. Esta linha corresponde a várias uniões entre dois filamentos de actina. A parte da miofibrilha que fica entre duas linhas Z sucessivas é que se denomina sarcómero. Cada sarcómero mede cerca de 2 µm de comprimento quando em repouso.

A faixa central do sarcómero é mais escura e chama-se **banda A**, é constituída por filamentos de miosina parcialmente sobrepostos pela actina. Dentro da banda A existe uma região mediana mais clara, a **banda H** (Figura 3), que contém apenas filamentos de miosina. Uma linha escura, chamada de **região M**, pode ser observada com mais evidência ao microscópio electrónico no centro do sarcómero (Berne *et al.*, 2004; McComas, 1996).

A molécula de **miosina** é constituída por seis cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves. As duas cadeias pesadas enrolam-se em espiral, uma em redor da outra para formar uma dupla hélice, que é denominada **cauda** da molécula de miosina. Uma extremidade de cada uma dessas cadeias é dobrada em estrutura polipeptídica globular, denominada **cabeça** da miosina. As quatro cadeias leves também fazem parte da cabeça da miosina, ajudam a controlar a função da cabeça durante a contração muscular. Os filamentos de miosina são denominados de filamentos grossos e formam-se por uma associação cauda-a-cauda de moléculas de miosina (Berne *et al.*, 2004; Guyton e Hall, 2002).

A **actina** é uma proteína globular (actina G), que polimeriza num filamento com dois cordões torcidos em hélice (actina F). Os filamentos de actina são também conhecidos como filamentos finos. A tropomiosina e as três moléculas de troponina; TnC, TnI, TnT, formam os outros constituintes dos filamentos finos.

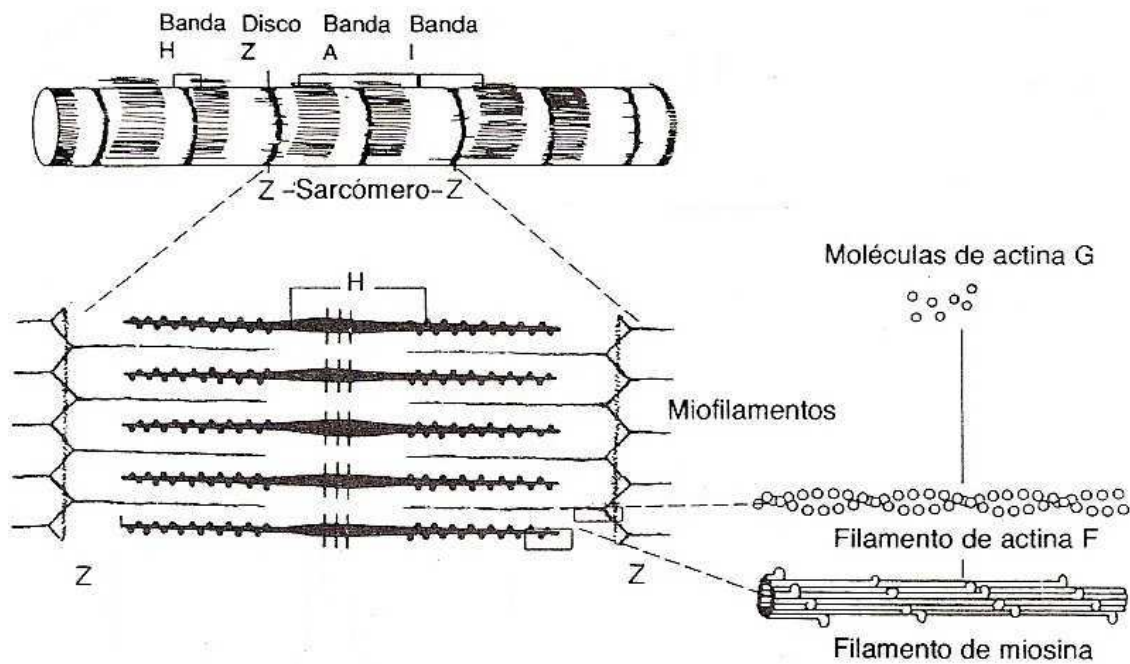


Figura 3- Representação esquemática do sarcômero. (Adaptado Junqueira e Carneiro, edição 10, 2004).

A **tropomiosina** é uma molécula longa e fina, constituída por duas cadeias polipeptídicas enroladas uma na outra, que se estende ao longo de sete monómeros de actina, bloqueando os sítios de ligação da miosina. A **troponina** é formada por três moléculas: **TnC** proteína de ligação ao cálcio, **TnI** unidade inibitória, com grande afinidade pela actina e **TnT** que se liga à tropomiosina (Jones *et al.*, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004).

As miofibrilhas de actina e miosina estão suspensas no interior da fibra muscular por uma matriz intracelular chamada **sarcoplasma**. Esta matriz intracelular contém grande quantidade de sais minerais e enzimas proteicas, bem como grande número de mitocôndrias. A fibra muscular contém um citoesqueleto que mantém as diferentes estruturas intracelulares na sua posição. São várias as proteínas enroladas em volta das miofibrilhas e da linha Z que mantêm a organização, algumas das quais são: a desmina, nebulina, titina e a distrofina (Junqueira e Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2004; McComas, 1996).

Cada célula muscular, com cerca de 1mm de diâmetro, contém muitas miofibrilhas paralelas que estão imersas no sarcoplasma, as miofibrilhas tem de diâmetro cerca de 1 µm e preenchem a fibra muscular em 80% do seu espaço, podem variar em número, dependendo do músculo, entre apenas 50 ou até 2000 miofibrilhas por fibra muscular (Jones *et al.*, 2004; McComas, 1996).

Dentro do endomísio e também a rodear cada fibra muscular está o **sarcolema**, este é constituído por uma **membrana basal** e pelo **plasmalema**. A membrana basal é composta por glicoproteínas (lâmina basal) e uma rede de colagénio (lâmina reticular), é permeável e pode envolver mais que uma fibra. O plasmalema tem uma composição química com propriedades adicionais de excitabilidade permitindo que os impulsos eléctricos sejam transmitidos ao longo da célula (McComas, 1996).

O sarcolema sofre invaginações, formando túbulos anastomosados que envolvem cada conjunto de miofibrilhas. Essa rede foi denominada **sistema T**, pois as invaginações são perpendiculares às miofibrilhas, este sistema é responsável pela contracção uniforme de cada fibra muscular estriada esquelética. Em volta do conjunto de miofibrilhas de uma fibra muscular esquelética situa-se o **retículo sarcoplasmático** (retículo endoplasmático liso), especializado no armazenamento de iões cálcio, a sua função, depois de receber o impulso vindo dos túbulos T é libertar cálcio no citosol que rodeia as miofibrilhas permitindo assim a contracção muscular. As invaginações do sarcolema (túbulos T) formam uma associação íntima com duas cisternas terminais do retículo sarcoplasmático chamada de tríade (Berne *et al.*, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004; Kierszenbaum, 2004).

O músculo esquelético é controlado pelo sistema nervoso central. O neurónio motor responsável por cada músculo, origina ramificações axónicas que atravessam o perímio e se ligam a cada fibra muscular. Um único impulso com origem no neurónio motor, estimula todas as fibras musculares a que está ligado, ao mesmo tempo, gerando um potencial de acção sincronizado. O terminal axónico apresenta numerosas mitocôndrias e vesículas sinápticas com o neurotransmissor excitatório acetilcolina (Berne *et al.*, 2004; Guyton e Hall, 2002).

1.1.4 Mecanismo da contração muscular

O estímulo para a contração muscular é gerado por um impulso nervoso, que chega à fibra muscular através de um nervo. O impulso nervoso propaga-se pela membrana das fibras musculares (sarcolema) e atinge o retículo sarcoplasmático, fazendo com que o cálcio ali armazenado seja libertado no citosol e suba exponencialmente a sua concentração. Ao entrar em contacto com as miofibrilhas, o cálcio liga-se à troponina C e desbloqueia a ligação da tropomiosina à actina, permitindo que esta se ligue à miosina, iniciando a contração muscular. Após uma fracção de segundo, os iões cálcio são bombeados de volta para o retículo sarcoplasmático, por uma bomba de cálcio da membrana, permanecendo aí armazenados até à chegada de novo impulso nervoso. A remoção dos iões cálcio das miofibrilhas é responsável pelo cessar da contração muscular. Normalmente a quantidade de cálcio dentro da célula é muita baixa e os locais de ligação da troponina C não estão ocupados e assim a troponina bloqueia a tropomiosina.

A contração do músculo esquelético é voluntária e ocorre pelo deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina. Nas pontas dos filamentos de miosina existem pequenas projecções (cabeça da miosina), capazes de formar ligações com certos sítios dos filamentos de actina, quando o músculo é estimulado. Essas projecções de miosina puxam os filamentos de actina, forçando-os a deslizar sobre os filamentos de miosina. Isso leva ao encurtamento das miofibrilhas e à contração muscular. Durante a contração muscular, o sarcómero diminui devido à aproximação das duas linhas Z, e a zona H chega a desaparecer. Assim que cessa o estímulo, o Ca^{2+} é imediatamente bombeado para o interior do retículo sarcoplasmático, o que faz cessar a contração. Para que o cálcio seja libertado é necessário que haja energia metabólica na forma de ATP (Guyton e Hall, 2002; Jones *et al.*, 2004; Mathews, 2003; McComas, 1996).

Quando as cabeças da miosina se ligam ao filamento de actina, ocorre a hidrólise do ATP em ADP. A reposição do ATP necessário, para a continuação da contração muscular, é fornecido pela **creatinafosfoquinase**, enzima que se encontra na forma solúvel no sarcoplasma. A creatinafosfoquinase catalisa a transferência do fosfato da fosfocreatina para o ADP. A energia da hidrólise do ATP produz uma mudança na

posição da cabeça da miosina e os filamentos finos são traccionados, deslizando pelos filamentos grossos. A contracção resulta da sobreposição completa das bandas A e I.

1.1.5 Sistema de produção de energia

A célula muscular esquelética é adaptada para a produção de trabalho mecânico, necessitando de depósitos de compostos ricos em energia. A contracção muscular depende da energia fornecida pelo ATP, as ligações dos radicais fosfato à molécula são ligações fosfato de alta energia. Quando um radical fosfato é removido, é libertada energia que vai fazer contrair o músculo, esta remoção transforma o ATP em ADP. As reservas de ATP no músculo esquelético são pequenas e capazes de suportar apenas algumas contracções, se não houver reposição de ATP. A primeira fonte de energia usada para reconstituir o ATP é a substância **fosfocreatina**, que contém ligações fosfato de alta energia (Guyton e Hall, 2002).

Os sistemas metabólicos que são requisitados na actividade física são: o **sistema de fosfocreatina-creatina**, o **sistema do glicogénio-ácido láctico** e o **sistema aeróbio**. O ATP presente nos músculos é suficiente para apenas três segundos de actividade muscular. A fosfocreatina é outro composto químico com ligações de alta energia que vai reconstituir o ADP em ATP, esta reconstituição processa-se numa pequena fracção de segundo e fornece ao músculo energia para apenas mais alguns segundos (o ATP e a fosfocreatina existentes na célula proporcionam energia para cerca de oito a dez segundos).

O glicogénio armazenado no músculo pode ser desdobrado em glicose que vai ser utilizada para obtenção de energia. O processo de recrutamento de glicogénio, denominado glicólise, ocorre sem utilização de oxigénio, constituindo assim o metabolismo anaeróbio. Cada molécula de glicogénio é desdobrada em duas moléculas de ácido pirúvico e glicose, esta liberta energia para formar ATP. O ácido pirúvico por sua vez, entra nas mitocôndrias das células musculares e na presença de oxigénio vai formar ainda mais moléculas de ATP. No entanto, se as reservas de oxigénio forem insuficientes para que esta segunda etapa ocorra, a maior parte do ácido pirúvico será transformada em ácido láctico. Este sistema proporciona energia suficiente para que o músculo funcione durante cerca de minuto e meio. A importância do mecanismo da glicólise é duplo, a sua reacção pode ocorrer mesmo na ausência de oxigénio e o ritmo

de formação de ATP pelo processo glicolítico é 2^{1/2} vezes mais rápido do que a formação do ATP quando os nutrientes celulares reagem com o oxigênio (Guyton e Hall, 2002).

O sistema aeróbio representa a oxidação dos nutrientes nas mitocôndrias para fornecer energia. A glicose, os ácidos gordos e os aminoácidos dos nutrientes, após algum processamento intermediário, combinam-se com o oxigênio, de forma a libertarem energia para reconstituir o ATP. Este sistema fornece energia pelo tempo que durarem os nutrientes (Guyton e Hall, 2002). Em provas atléticas que duram mais que o minuto e meio, em que o sistema de fosfocreatina-creatina e o do glicogênio-ácido láctico conseguem suprir a energia suficiente, os hidratos de carbono são os principais nutrientes a fornecer a energia necessária. Quando o tempo dessas provas se prolonga, as gorduras são uma boa reserva.

Quando o músculo exerce actividade intensa, pode haver insuficiência de oxigênio, e a célula recorre ao metabolismo anaeróbio da glicose (glicólise), com produção de ácido láctico. O excesso de ácido láctico pode causar acidificação tecidual e provocar caímbrias com intensa dor muscular (Guyton e Hall, 2002; Junqueira e Carneiro, 2004).

1.1.6 Propriedades das fibras

Cada músculo esquelético é constituído por uma mistura de fibras denominadas genericamente de **contração rápida** ou de **contração lenta**. Os músculos que reagem rapidamente, são constituídos, essencialmente, por fibras de contração rápida, com uma pequena percentagem de fibras de contração lenta. O contrário acontece nos músculos que reagem mais lentamente, porém com contração prolongada, são constituídos maioritariamente por fibras de contração lenta (Berne *et al.*, 2004; Guyton e Hall, 2002).

Há também uma correlação entre a velocidade de contração e a actividade da ATPase da miosina, que têm a ver com a expressão das diferentes isoformas da miosina nos dois tipos de fibras musculares. Métodos histoquímicos podem ser usados para diferenciar os tipos de fibras, estes métodos baseiam-se na actividade da ATPase da miosina. Uma das mais comuns técnicas de coloração para diferenciar os tipos de fibras, baseia-se na diferença de estabilidade das várias miosinas quando incubadas em meios ácidos ou alcalinos. As fibras rápidas são do **tipo II** e as fibras lentas são do **tipo I** (Berne *et al.*, 2004).

As fibras musculares podem ainda, ser classificadas com base nas suas propriedades funcionais e metabólicas em: rápidas e glicolíticas (RG); rápidas e glicolíticas oxidativas (RGO) e lentas e oxidativas (LO). As RG e as RGO são do tipo rápido, caracterizadas por possuírem grande actividade do retículo sarcoplasmático e da adenosinotribose miofibrilar (ATPase) e correspondem a estímulos isométricos curtos e velocidades máximas altas. As fibras LO possuem baixa actividade do retículo sarcoplasmático e da ATPase miofibrilar. Cada tipo de fibra contém uma isoenzima específica para a proteína da miosina contráctil e as fibras são frequentemente identificadas com base na sua histoquímica, determinada pela ATPase da miosina que está activa, podendo ser do tipo I, IIa ou IIb (Fitts, 1994).

O método histoquímico que permite distinguir os diferentes tipos de ATPases da miosina, consiste em incubar um corte histológico de músculo num pH ácido e noutro alcalino, a miosina rápida é inactivada em pH ácido (pH 4.3-4.6) enquanto a miosina lenta é inactivada a pH alcalino (pH 9.4). Tendo inactivado a actividade da ATPase pode-se visualizar a restante actividade incubando o corte histológico de músculo com ATP e com excesso de cálcio com um pH ligeiramente alcalino para que o fosfato inorgânico libertado precipite sob a forma de fosfato de cálcio. Segue-se uma série de manipulações que permitem visualizar o fosfato de cálcio de cor castanho escuro ou preto. A miosina ATPase revelada desta forma é referida como sendo de alta ou baixa actividade. A miosina mais rápida tende a ser estável a pH alcalino e lábil no ácido, enquanto a miosina mais lenta se comporta de modo contrário (Junqueira e Carneiro, 1990; Jones *et al.*, 2004).

As fibras do tipo II estão subdivididas em dois grupos convencionais chamados **tipo IIa** e **IIb**, referindo-se ainda a existência de um quarto grupo (**tipo IIc**) que representa a miosina encontrada nos embriões e em fibras em regeneração (Jones *et al.*, 2004). No rato, a aproximação destes tipos de miosina é um pouco mais complexo, uma vez que ele apresenta um tipo adicional conhecido como **IIx**, também denominado **IId** (Berchtold *et al.* 2000; Jones *et al.*, 2004). As fibras do tipo II podem ser diferenciadas com base na sua susceptibilidade quando incubadas durante cinco minutos em pH ácido. As fibras IIa são inibidas a um pH de 4.5, as do tipo IIb têm inibição abaixo do pH 4.3 e as do tipo IIc abaixo do pH 3.9. Estas diferenças de sensibilidade são pequenas mas os resultados são reprodutíveis (Brooke and Kaiser, 1970).

As fibras do **tipo I** (fibras lentas), de cor vermelho-escuro são ricas em mioglobina; têm um sistema de vasos sanguíneos mais extenso, para proporcionar uma quantidade

superior de oxigênio; têm mitocôndrias em abundância; têm um diâmetro relativamente pequeno; contêm um maior número de mionúcleos por unidade de comprimento do que as fibras rápidas; são resistentes à fadiga, estão adaptadas a actividades de longa duração, como é o caso da manutenção da postura e das provas de atletismo contínuas e prolongadas, por exemplo as corridas de maratona (Guyton e Hall, 2002; Kierszenbaum, 2004).

As fibras do **tipo II** (fibras rápidas) contêm pouca mioglobina e são de cor vermelho-claro, normalmente designadas fibras brancas; têm um diâmetro maior, para maior força de contracção, que as fibras lentas; têm menor número de mionúcleos do que as fibras do tipo I; têm menor quantidade de mitocôndrias uma vez que utilizam mais o sistema glicolítico, e por usarem mais o sistema glicolítico possuem grande quantidade de enzimas glicilíticas; não têm um sistema de vasos sanguíneos tão extenso como as fibras do tipo I; têm um extenso retículo sarcoplasmático, para uma libertação rápida dos iões cálcio; são fibras de contracção rápida, como é o caso das fibras que participam no movimento rápido e poderoso, na corrida de alta velocidade (Guyton e Hall, 2002; Kierszenbaum, 2004).

No músculo *gastrocnemius* do rato as fibras do tipo I são similares às do tipo I humanas. As fibras do tipo II, no rato, subdividem-se: um subgrupo corresponde possivelmente ao tipo IIa humano com uma inibição quase completa quando incubado a um pH de 4.5, um segundo grupo de fibras é totalmente inibido numa incubação de pH 4.3 ou mais baixo, correspondendo ao tipo IIb humano. No músculo *soleus* do rato as fibras do tipo I tem o mesmo comportamento que as do músculo *gastrocnemius*. As fibras do tipo II subdividem-se em dois grupos, um dos quais corresponde ao tipo IIa do *gastrocnemius* e o outro ao tipo IIc humano, este último tipo de fibra é ligeiramente inibido abaixo do pH 4.7 mas é necessário baixar o pH a 3.9 para a sua completa inibição (Brooke and Kaiser, 1970).

Todos os músculos têm percentagens variáveis de fibras de contracção rápida e de contracção lenta. Por exemplo, o músculo *gastrocnemius* têm maior quantidade de fibras de contracção rápida, o que lhe confere a capacidade de contrair de forma vigorosa e rápida. Pelo contrário, o músculo *soleus* têm maior quantidade de fibras musculares de contracção lenta e, por isso, é usado maioritariamente para a actividade prolongada das pernas (Guyton e Hall, 2002).

Algumas pessoas têm muito mais fibras de contracção rápida do que fibras de contracção lenta, e outras têm mais fibras de contracção lenta. Esta diferença hereditária

pode determinar se um atleta têm maior capacidade para desportos de longa duração ou para provas de alta velocidade e curta duração (Guyton e Hall, 2002). O treino aeróbio parece induzir uma diminuição das fibras rápidas e um aumento das fibras lentas (Roels *et al.*, 2008; Schluter e Fitts, 1994).

1.1.7 Alterações musculares

Em circunstâncias normais o músculo esquelético dum mamífero adulto é um tecido estável com muito pouca actividade mitótica (Chargé *et al.*, 2004). No entanto o músculo esquelético demonstra uma plasticidade notável adaptando-se a uma grande variedade de estímulos externos, incluindo a actividade contráctil proporcionada pelo exercício físico (Zierath e Hawley, 2004), que leva à hipertrofia muscular; e a imobilização, que acontece devido a lesões causadas no próprio músculo ou em tecidos que lhe estão associados (ossos, tendões, nervos, etc), à velhice, a má alimentação, entre outros, e que neste caso conduz à atrofia (Jackman e Kandarian, 2004; Arias *et al.*, 2001).

A **hipertrofia** e a **atrofia** são duas alterações opostas que podem ser encontradas no músculo patológico. Para manter a homeostasia o corpo humano gera uma resposta biológica, um balanço dinâmico no processo de catabolismo e anabolismo, tanto no músculo hipertrófico como no músculo atrofico (Boonyarom e Inui, 2006).

Uma outra alteração muscular é a **hiperplasia**, que consiste na formação de novas fibras musculares, é um fenómeno que pode ocorrer com alguma frequência no músculo liso mas é raro no músculo esquelético. Essa capacidade resulta da diferenciação das células satélite presentes no tecido muscular. No entanto quando a destruição celular é grande dá-se uma substituição por tecido cicatricial (Berne *et al.*, 2004, Junqueira e Carneiro, 2004).

A **hipertrofia** é um processo multidimensional que envolve vários factores, tais como: factores de crescimento, hormonas, sistema imunitário, células satélite, entre outros. A actividade de mRNA aumenta (g proteína/ μ g mRNA) após exercício de resistência isotónico agudo. As fibras do tipo rápido respondem com mais intensidade que as do tipo lento (Boonyarom e Inui, 2006). A resposta adaptativa do músculo ao exercício físico intensivo é a hipertrofia, que se caracteriza por um aumento do volume e número das miofibrilhas. Este aumento só se verifica devido à inserção de novos núcleos que

mantêm a relação volume citoplasmático/núcleo. A hipertrofia está dependente da activação proliferativa das células satélite e da sua diferenciação miogénica, estas células são quiescentes e só 1 a 2% dos mionúcleos é que são substituídos semanalmente, mas em caso de lesão muscular ou na hipertrofia, estas células são recrutadas para substituir ou aumentar o número de núcleos existentes.

O músculo hipertrófico caracteriza-se pelo aumento da acumulação proteica nas células musculares estimuladas, havendo um aumento da síntese proteica nomeadamente de proteínas musculares contrácteis e metabólicas e uma diminuição na degradação dessas mesmas proteínas (Chargé e Rudnicki, 2004; Adams *et al.*, 2004).

A hipertrofia muscular desenvolve-se após trabalho ou treino de esforço continuado de algumas semanas e é directamente proporcional a um aumento do potencial de produção de força. As miofibrilhas aumentam a área em corte transversal, para dar resposta a uma necessidade de maior produção de força (Russell *et al.*, 2000).

A **atrofia** muscular esquelética, atribuída à inactividade muscular ou em caso de imobilização, caracteriza-se pela perda da massa muscular. Também os astronautas, expostos a um meio de microgravidade, em que há redução da carga mecânica nos músculos, estão sujeitos a uma diminuição da massa muscular. Verifica-se uma diminuição visível do tamanho ou do número das miofibrilhas e a nível molecular há uma diminuição da síntese e um aumento da degradação proteica (Berne *et al.*, 2004; Jackman e Kandarian, 2004).

O processo que regula a extensão da atrofia muscular é baseado na diminuição da síntese proteica, no aumento da destruição oxidativa e subsequente degradação proteica desregulada (Boonyarom e Inui, 2006). Nos doentes imobilizados, em estado crítico, o começo da atrofia muscular é rápido e grave, começando ao fim de 4 horas de hospitalização. Os músculos antigravidade ou dos grupos extensores, que frequentemente se contraem para suportar o peso do corpo, tal como o *soleus* e o *gastrocnemius*, que têm por principal função manter a postura em pé ao longo do dia, mostram maior atrofia que os não gravitacionais ou dos grupos flexores (Edgerton e Roy, 2000; Fitts *et al.*, 2000).

O tipo predominante de fibras que cada músculo possui, é também um factor que interfere na adaptação muscular em caso de atrofia, os músculos que possuem na sua composição fibras do tipo lento (resistentes à fadiga) com uma alta capacidade oxidativa, como é o caso do *soleus*, são mais afectados do que aqueles que possuem fibras do tipo rápido (não resistentes à fadiga), como é o caso do *gastrocnemius*. Uma análise das

fibras musculares revela uma diminuição do seu diâmetro e uma alteração do tipo de fibras, os músculos que contêm um maior número de fibras do tipo lento (tipo I) parecem mudar rapidamente para fibras do tipo rápido (tipo II) quando sujeitas a longos períodos de imobilização (Boonyarom e Inui, 2006; Chargé e Rudnicki, 2004; Roy *et al.*, 1992).

As alterações do músculo atrofico, a nível celular são: dissolução do sarcómero e degradação endotelial, redução do número de mitocôndrias, acumulação de tecido conjuntivo, eliminação dos mionúcleos apoptóticos e uma diminuição da densidade capilar. A aparência geral mostra uma redução considerável na secção de corte transversal da fibra muscular (Boonyarom e Inui, 2006). Nos músculos atroficos a quantidade de proteínas miofibrilares contrácteis, de α -actina mRNA e da miosina das cadeias pesadas (MHC) mRNA, estão muito reduzidas. Comparando o mesmo peso de massa muscular, há uma diminuição da utilização da β -hidroxibutirato, palmitato e glicose, e os níveis dos fosfatos de alta energia diminuem, tal como os níveis das enzimas oxidativas (citrato sintetase, fosfoquinase e malato desidrogenase). Em ratos, na primeira semana, há um declínio da síntese proteica, e na segunda semana já se começa a verificar a degradação das miofibrilhas (Haddad *et al.*, 2003b; Thomason *et al.*, 1989).

1.1.8 Regeneração

O músculo esquelético têm a capacidade de regeneração, no entanto quando a destruição celular é grande dá-se uma substituição do tecido muscular por tecido cicatricial, apresenta proliferação do tecido conjuntivo, sobretudo com fibras de colagénio (Berne *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004).

A primeira fase do processo de lesão muscular caracteriza-se pela activação das células mononucleares, principalmente pelas células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) e pelas células miogénicas. Os neutrófilos são os primeiros a invadir o tecido lesado, mais tarde, cerca de 48 horas depois aparecem os macrófagos, estes infiltram-se no tecido e fagocitam os restos celulares e activam as **células satélite** (Chargé e Rudnicki, 2004; Mehl *et al.*, 2005).

Algumas células satélite diferenciam-se em mioblastos ou dão origem a novas células satélite. A adição de sarcómeros em série ou de novos filamentos contrácteis como

resposta ao exercício é um mecanismo ainda pouco conhecido. A regeneração do músculo esquelético é um processo que envolve degeneração das fibras com subsequente influxo de leucócitos no local da lesão, só depois a regeneração começa após as células inflamatórias terem limpo o tecido necrótico (Philippou *et al.*, 2007). Está estabelecido que uma série de redes de transcrição, controlam a proliferação, renovação e diferenciação terminal das células satélite. A família dos factores de transcrição conhecida como factores reguladores miogénicos (MRFs), são essenciais neste processo, alguns desses factores são: o MyoD, e o Myf5 que estão associados com a proliferação e renovação das células satélite; enquanto a miogenina e o MRF4 são responsáveis pela diferenciação terminal dos precursores miogénicos. Também os genes da família Pax, incluindo o Pax3 e o Pax7, estão implicados na regulação das células satélite, principalmente o Pax7 (Launay *et al.*, 2001; Parise *et al.*, 2006).

As **células satélite** são uma população de células miogénicas mononucleares indiferenciadas que se encontram no músculo esquelético. Estas células podem ser identificadas em microscopia electrónica, localizam-se dentro da lâmina basal rodeadas pelas miofibrilhas, justapostas entre a membrana plasmática e a fibra muscular. Têm o núcleo aumentado em relação ao citoplasma, contêm poucos organelos, o núcleo é mais pequeno que o da fibra muscular, apesar da quantidade de heterocromatina estar aumentada. A sua identificação ao microscópio de luz é mais ambígua, mas podem ser usados marcadores imunohistoquímicos, como a laminina e a distrofina, para identificar a lâmina basal e o sarcolema respectivamente, o que facilita a visualização destas células (Chargé e Rudnicki, 2004). Após uma lesão ou outro estímulo, as células satélite tornam-se activas, proliferam por divisão mitótica e fundem-se umas às outras para formar novas fibras musculares esqueléticas.

Nesta fase de regeneração das miofibrilhas os núcleos estão centralmente localizados e o seu calibre é maior e mais granular e possuem proeminentes nucléolos, são frequentemente basófilas o que reflecte uma grande síntese proteica. A ramificação das fibras do músculo em regeneração também é uma característica e deve-se provavelmente à fusão incompleta das fibras dentro da mesma lâmina basal. As células satélite também entram em mitose quando o músculo é submetido a exercício intenso, nesse caso elas fundem-se com as fibras musculares já existentes, contribuindo para a hipertrofia muscular. Um número maior de células satélite está associado a fibras musculares do tipo lento do que a fibras do tipo rápido, a quantidade deste tipo de

células vai diminuindo com a idade (Ali, 1979; Chargé e Rudnicki, 2004; Junqueira e Carneiro, 2004).

O exercício extenuante induz evidências histológicas de lesão segmentar e subsequente regeneração numa pequena percentagem de fibras, e um aumento na activação e proliferação das células satélite (Smith *et al.*, 2001).

A proteína contráctil miosina, desempenha um papel importante nas propriedades funcionais das fibras musculares esqueléticas. A miosina existe sob diversas isoformas, como resultado da sua expressão polimórfica, tanto nos componentes da parte leve como nos componentes da parte pesada da molécula (Demirel *et al.*, 1999). A miosina da cadeia pesada (MHC) é uma proteína miofibrilar muito importante, que dita fortemente a taxa de força desenvolvida e a velocidade máxima de encurtamento das pontes cruzadas de miosina e actina. As fibras musculares classificadas segundo o tipo de MHC são as seguintes: tipo I, tipoIIa, tipo IIb/x e tipo IIb, que se encontram enumeradas pela ordem crescente de velocidade de encurtamento das pontes cruzadas. Na prática de exercício físico intenso há uma transformação do tipo de fibras rápidas em fibras lentas. No estudo de Martins *et al.* (2009) com ratos Wistar, o músculo *tibialis anterior* foi exposto a radiação para inactivação da população de células satélite enquanto era estimulado por períodos regulares com uma estimulação crónica de baixa frequência. Na ausência duma população de células satélite viáveis essa transformação fica atenuada (Martins *et al.*, 2009).

1.1.9 Efeito do exercício sobre o músculo esquelético

O treino desportivo tem obtido importantes evoluções nos últimos anos, principalmente devido ao avanço da pesquisa científica. Verificam-se alterações tanto fisiológicas como bioquímicas que levam a um melhor desempenho de tarefas específicas que são dependentes do tipo de actividade física realizada.

O treino físico pode variar de acordo com os objectivos, podendo ser de força ou aeróbico. Estes treinos são importantes para a manutenção da saúde e desempenham um papel fundamental na manutenção da massa muscular. Os métodos para se treinar tanto de forma aeróbica quanto anaeróbica (força) são diferentes. O exercício aeróbico pode ser realizado tanto em piscinas, pistas, bicicletas, tapetes rolantes, etc. Já o exercício de

força, geralmente é realizado com algum equipamento que propicie alguma resistência (Silva *et al.*, 2007).

Durante a transição repouso-exercício ou qualquer outra actividade da vida diária que gere um aumento da intensidade do metabolismo, o organismo sofre uma série de ajustes para que os sistemas energéticos consigam a energia necessária. Como as reservas musculares de oxigénio, ATP e fosfocreatina são limitadas, o sistema oxidativo (absorção, transporte e utilização de oxigénio) vai sendo progressivamente activado na tentativa de se atingir a estabilidade, e retornar à homeostase celular (Denadai e Caputo, 2003).

A especificidade do treino é talvez o princípio mais significativo usado na preparação dum atleta. Um dos requerimentos, que precede uma implementação ou um plano de treino, é, verificar a capacidade aeróbica de cada indivíduo (Spencer and Gustin, 2000).

O exercício extenuante pode causar lesões musculares, isso evidencia-se através do músculo dorido. As contracções musculares excêntricas (com estiramento do músculo) parecem causar maiores danos musculares que as contracções isométricas ou as contracções concêntricas (com encurtamento do músculo). O estiramento muscular implica níveis de força superiores do que os necessários para contracções isométricas ou por encurtamento muscular, e os grandes esforços são sugeridos como sendo uma causa para as lesões musculares (Lynch e Faulkner, 1998; McCully e Faulkner, 1986).

Investigadores utilizam o tapete rolante quase exclusivamente para avaliar a fisiologia da corrida em laboratório. Do ponto de vista prático não ocorrem diferenças mensuráveis nos requerimentos aeróbicos no tapete rolante ou na pista de corrida ou na VO₂máx medida em ambas as formas de exercício em condições ambientais similares (McArdle *et al.*, 2005; Fewell *et al.*, 1997).

1.1.10 O óxido nítrico (NO) e o seu papel no músculo esquelético

Desde a sua descoberta em 1987, a molécula **óxido nítrico** (NO) têm mostrado estar envolvida numa série de processos biológicos e fisiopatológicos. O NO é o maior mediador nas lesões dos tecidos durante uma isquémia com reperfusão, têm acções bifásicas de citoprotecção e citotoxicidade.

O NO é altamente reactivo devido à presença de um electrão desemparelhado, tem uma semi-vida muito curta e pode difundir-se através das membranas. É considerado um

neurotransmissor, devido à sua característica de alta difusibilidade, não necessitando de receptores de membrana, leva a que a resposta seja rápida e precisa.

O NO forma-se como resultado do produto metabólico de conversão do aminoácido L-arginina em citrolina, pela hidroxilação de um átomo de guanidina da L-arginina. A reacção é catalizada pela enzima NO sintetase (NOS). Até à data, três isoformas distintas de NOS foram identificadas: NOS neuronal (nNOS), também chamada tipo 1; NOS indutível (iNOS), também chamada tipo 2; e NOS endotelial (eNOS), também chamada tipo 3 (Frandsen *et al.*, 1996; Khanna *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2004; Sardo e Ferraro, 2007).

As três isoformas de NOS resultam de diferentes genes, têm diferentes localizações, regulação, propriedades catalíticas e diferente sensibilidade inibitória. Estas isoformas foram diferenciadas aquando da sua descoberta com base na sua expressão constitutiva (nNOS e eNOS) ou indutiva (iNOS) e na sua dependência do cálcio (nNOS e eNOS) ou da sua independência (iNOS). Hoje sabe-se que todas as isoformas podem ter a sua expressão regulada, apesar dos estímulos que as regulam serem diferentes, e que também a iNOS pode ser constitutiva (Alderton *et al.*, 2001; Forstermann *et al.*, 1998).

Uma classificação das NOS é determinada pela dependência que têm do Ca^{2+} para serem activadas. O Ca^{2+} é um importante sinalizador citoplasmático que se liga a proteínas intracelulares receptoras específicas. Uma delas é a calmodulina, quando o Ca^{2+} se liga a ela (calmodulina) forma-se o complexo Ca^{2+} /calmodulina, que é um elemento regulador de algumas actividades enzimáticas intracelulares. Quando o complexo se desfaz devido aos baixos níveis de Ca^{2+} , a actividade enzimática é desactivada e há inactivação da NOS. A iNOS só necessita de Ca^{2+} citoplasmático para ser activado mas a sua diminuição no meio não inibe a actividade da iNOS (Flora Filho e Zilberstein, 2000).

No músculo esquelético o NO desempenha um papel na regulação da produção de força, na autoregulação da corrente sanguínea, na respiração tecidular e no metabolismo da glicose (Tsui *et al.*, 2007).

O estudo de Frandsen *et al.* (1996) demonstrou a presença de nNOS no sarcolema e no citoplasma de todas as fibras musculares com forte expressão nas fibras musculares do tipo I. O mesmo estudo demonstrou a presença de eNOS no endotélio dos grandes vasos sanguíneos e nos microvasos, a sua função é o controlo do fluxo sanguíneo no músculo esquelético. A demonstração de nNOS no músculo esquelético por Nakane *et al.* (1993) e Kobzik *et al.* (1994) permitiu o melhor conhecimento de muitos processos fisiológicos

nos quais esta proteína (nNOS) e o seu produto, o NO, estão implicados (Tidball *et al.*, 1998).

A proteína nNOS e os níveis de mRNA no músculo esquelético são regulados pela actividade mecânica. Muitas evidências mostram que o NO é um tradutor mecanogénico, o qual envolve uma grande variedade de mecanismos em resposta à actividade mecânica, que leva à regulação do crescimento celular, da diferenciação, da migração e da apoptose. A enzima nNOS é a isoforma mais abundante no músculo esquelético e a sua expressão aumenta significativamente durante a formação de células multinucleadas do músculo esquelético em cultura (Jingying *et al.*, 2004).

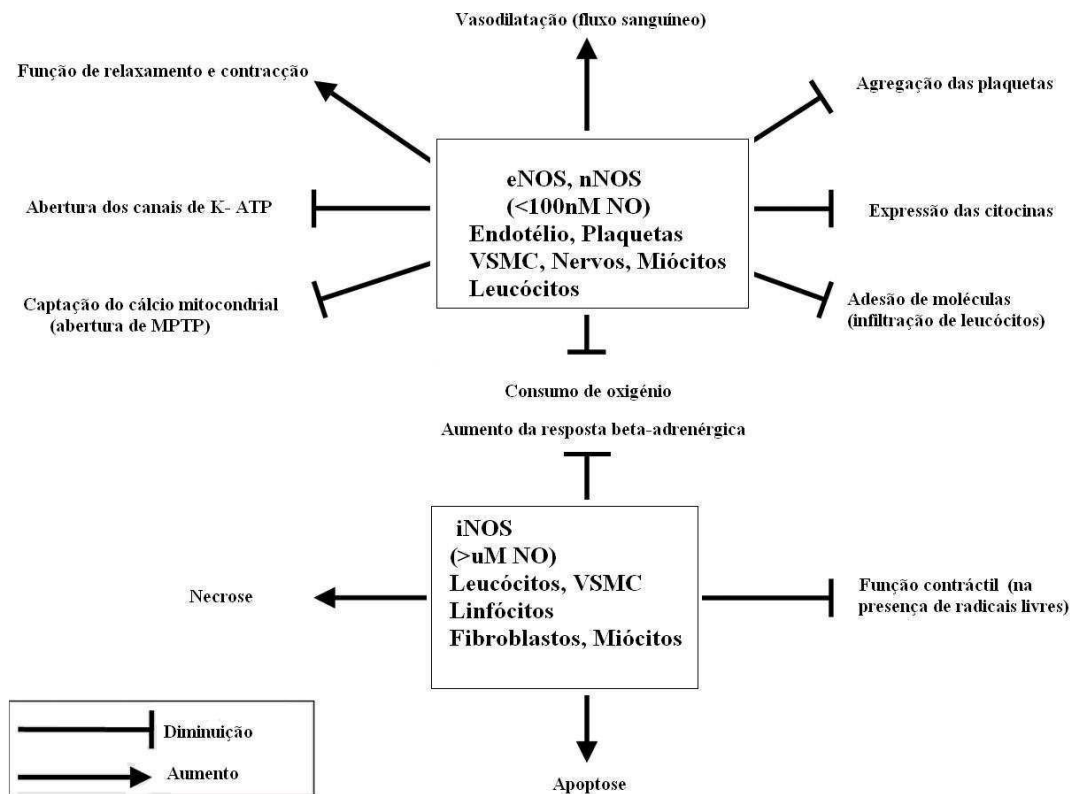


Figura 4- Efeito das baixas (derivadas da eNOS ou nNOS) ou altas (derivadas da iNOS) concentrações de NO (Schulz *et al.*, 2004).

A isoforma nNOS expressa-se em grandes concentrações nas fibras musculares do tipo rápido, expressa-se no citoesqueleto onde está ligada à distrofina, dentro do complexo

distroglicano. A isoforma eNOS está associada à mitocôndria. A actividade destas duas isoformas, a nNOS e a eNOS, está dependente da dupla cálcio/calmodulina (Smith *et al.*, 2002). A isoforma iNOS é independente do Ca^{2+} e expressa-se no músculo em pequenas quantidades, pode aumentar drasticamente devido às citocinas proinflamatórias. A produção excessiva de NO e iNOS pode estar envolvida no desgaste e lesão do músculo. Inibidores de NOS mostraram haver redução da inflamação e necrose do músculo em caso de lesão (Song *et al.*, 2009).

No estudo de Song *et al.* (2009) a expressão da proteína nNOS diminui no músculo esquelético com a inactividade extrema. O exercício aumenta significativamente a expressão da proteína nNOS do músculo *gastrocnemius* e *soleus*, também aumenta a proteína eNOS no *gastrocnemius* mas não no *soleus*. A iNOS aumenta consideravelmente em relação à nNOS em ratos idosos e sedentários, mas com o exercício a relação iNOS/nNOS diminui acentuadamente. Doze semanas de exercício em tapete rolante reduz a expressão da proteína iNOS no músculo *gastrocnemius* em ratos idosos. O exercício parece atenuar os efeitos da idade, alterando o perfil da NOS existente no músculo, mas isso é dependente do tipo de fibra e das isoformas de NOS (Song *et al.*, 2009).

O NO é conhecido por ser um modelador da função do músculo esquelético. O músculo esquelético consiste em vários tipos de fibras, as quais diferem na sua contractilidade, no seu metabolismo entre outras propriedades. As fibras que marcam mais fortemente para a NOS são as fibras do tipo rápido e oxidativas glicolíticas, a sua expressão ocorre em fibras que podem mudar entre o metabolismo oxidativo e o glicolítico (Punkt *et al.*, 2006). A expressão de NOS nas fibras musculares do tipo II é mais susceptível de alterações do que nas fibras do tipo I (Harris *et al.*, 2008).

As fibras com metabolismo predominantemente oxidativo contêm nNOS no citoplasma e no sarcolema. O eNOS encontra-se em fibras com metabolismo predominantemente glicolítico (Punkt *et al.*, 2001). O iNOS é indutível nos macrófagos pelas endotoxinas e citocinas mas também pode ser constitutivo (Punkt *et al.*, 2002; Riede *et al.*, 1998). Níveis alterados de iNOS foram encontrados em fibras com necrose, miopatias inflamatórias e falha cardíaca crónica com activação de citocinas (Rudnick *et al.*, 2004). O NO está envolvido na activação das células satélite (Tatsumi *et al.*, 2005). A inibição da NOS (através de L-NAME na água de beber), atrasa a remoção dos restos celulares e diminui a formação de novos miotubos. As células satélite também expressam a nNOS e têm a topografia ideal para detectar um pico rápido de NO (Anderson, 2000). Uma

maior densidade de células satélite está perto das junções neuromotoras e adjacentes aos capilares, dando ideia que factores que chegam através destas estruturas, facilmente as estimulam para que desempenhem o seu papel (Chargé e Rudnicki, 2004).

O aumento do número de sarcómeros em série nas miofibrilhas do músculo esquelético é importante para a função e desenvolvimento normal do músculo. A adição de sarcómeros influenciam a força de extensão do músculo e a velocidade de contracção. Estímulos mecânicos estão envolvidos na regulação da adição de sarcómeros. A isoforma nNOS preenche os requisitos para ser responsável pela adição de sarcómeros. A sua actividade é regulada pela actividade mecânica, há um aumento da sua produção após alongamentos estáticos em músculos excisados. O NO que deriva da NOS é um modelador positivo para a adição de sarcómeros, e a suplementação de substrato do NOS evidenciam aumento do número de sarcómeros (Koh e Tidball, 1999).

2.Objectivos

Ao longo da vida o músculo esquelético vai sofrendo alterações consoante o estilo de vida de cada indivíduo. A diversidade de fibras musculares existentes nos diferentes músculos têm que ver com a função exercida por esses músculos.

Vários estudos têm demonstrado que as fibras musculares esqueléticas quando submetidas a exercício ou a imobilização, mostram alterações morfológicas, moleculares e funcionais.

Tem sido demonstrado nos últimos tempos que o exercício aeróbio pode modificar o tipo de fibras musculares predominantes no músculo estriado esquelético. Estas modificações têm sido referidas, principalmente, como uma “transformação” das fibras tipo II em fibras tipo I. Porém, a literatura é vaga ou inexistente no que respeita aos mecanismos associados a essa referida “transformação”. Uma vez que as fibras tipo I são mais resistentes à fadiga e mais adaptadas às actividades da vida diária é do maior interesse o esclarecimento dos mecanismos associados ou subjacentes a tais modificações do tipo de fibras. Acresce o facto de conhecidos os mecanismos da “transformação” das fibras musculares esqueléticas se poder intervir a nível patológico ou, por exemplo, na recuperação da atrofia após imobilização. A imobilização muscular de um membro, nomeadamente após traumatismo ortopédico ou devido a lesão muscular, causa uma rápida perda da massa muscular a qual pode levar meses de fisioterapia para ser recuperada. Actualmente não existem tratamentos seguros e efectivos, disponíveis para tratar a atrofia muscular.

Assim, é objectivo deste trabalho estudar as alterações musculares esqueléticas induzidas pelo exercício aeróbico, nomeadamente no que se refere à “transformação” de fibras tipo II em fibras tipo I.

Para tal, serão realizados estudos histológicos e moleculares com o intuito de fornecer mais informação sobre o comportamento das fibras musculares esqueléticas existentes em dois tipos de músculos (com diferentes constituições) quando submetidos a exercício aeróbio.

2.1 Objectivos Específicos

- Para atingir o objectivo principal serão utilizados ratos Wistar machos que serão treinados, em tapete rolante, com um protocolo aeróbio durante oito semanas.
- Todo o estudo será realizado em dois músculos dos membros posteriores; o músculo *soleus* com uma constituição dominante de fibras tipo I e o músculo *gastrocnemius medialis* com uma constituição dominante em fibras tipo II.
- Os músculos após o treino aeróbio, e por comparação com o controlo, serão analisados a nível histológico de forma a contabilizar o número de fibras de cada tipo (I e II) e de verificar possíveis alterações tecidulares induzidas pelo exercício.
- A literatura refere uma forte implicação das enzimas produtoras de óxido nítrico (NO sintetases - NOS) na modificação do tipo de fibras musculares com o exercício aeróbio. Por tal, será também estudada a relação da expressão das duas isoformas da NOS (indutível e constitutiva) com as alterações das fibras musculares encontradas como consequência do exercício aeróbio.

2.2 Hipóteses

Neste trabalho tentaremos dar resposta a várias hipóteses que consideramos serem as mais relevantes neste estudo. Assim, as hipóteses que se levantam com este estudo são as seguintes:

1. Será o exercício aeróbio suficiente para induzir a alteração do tipo de fibras musculares esqueléticas em ratos Wistar?
2. Pode o exercício aeróbio induzir alterações morfológicas/histológicas nos músculos *soleus* e *gastrocnemius* apesar da sua diferente constituição? Ou o exercício aeróbio modifica o tipo de fibras apenas em músculos com um tipo específico de fibras musculares?
3. A expressão da proteína NOS acompanha as alterações/modificações dos tipos de fibras, ou estará apenas relacionada com alterações funcionais e não estruturais?

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais e condições de experimentação

O estudo decorreu na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) e na Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra (FCDEF-UC), de acordo com os padrões éticos reconhecidos internacionalmente para a investigação em animais e cumprindo-se a legislação em vigor.

Utilizaram-se ratos Wistar adultos jovens (Figura 5), que começaram o ensaio com 8 semanas de idade e com pesos que variavam entre 249g e 300g. O grupo I era constituído por cinco animais, e o grupo II por oito, num total de 13 animais. Foi providenciada comida para roedores, do tipo padrão, e água *ad libitum*. A atmosfera era normal, com temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, e humidade de 50-60%, um ciclo de luz: escuro de 12 h cada.

Neste trabalho procedeu-se a uma experiência com dois grupos de animais: o grupo I que serviu de grupo controlo, fazendo apenas uma sessão de cinco minutos por semana, durante oito semanas, e o grupo II que fez um programa de exercício com cinco sessões semanais com aumento progressivo de duração e intensidade de treino durante oito semanas.



Figura 5- Ratos Wistar utilizados durante o trabalho. Os animais foram mantidos em gaiolas de acordo com as orientações estabelecidas pela legislação em vigor.

3.2 Programa de treino

O grupo I foi submetido a uma sessão semanal, durante oito semanas, de cinco minutos cada uma e a uma velocidade mínima de 6 cm/s num **tapete rolante** próprio para roedores (Chow *et al.*, 2006; Dudley *et al.*, 1982; Durante *et al.*, 2002; Holloszy, 1967). Este tempo mínimo no tapete rolante não será suficiente para alteração a nível muscular mas é necessário para despiste de algum mecanismo comandado pelo sistema nervoso e que provoque alguma alteração, sobretudo a nível molecular.

O grupo II foi exercitado durante oito semanas, o treino foi efectuado cinco dias por semana e os animais começaram com um tempo inicial de dez minutos a 6cm/s. O treino foi aumentando diariamente tanto em duração como em velocidade (Tabela 1).

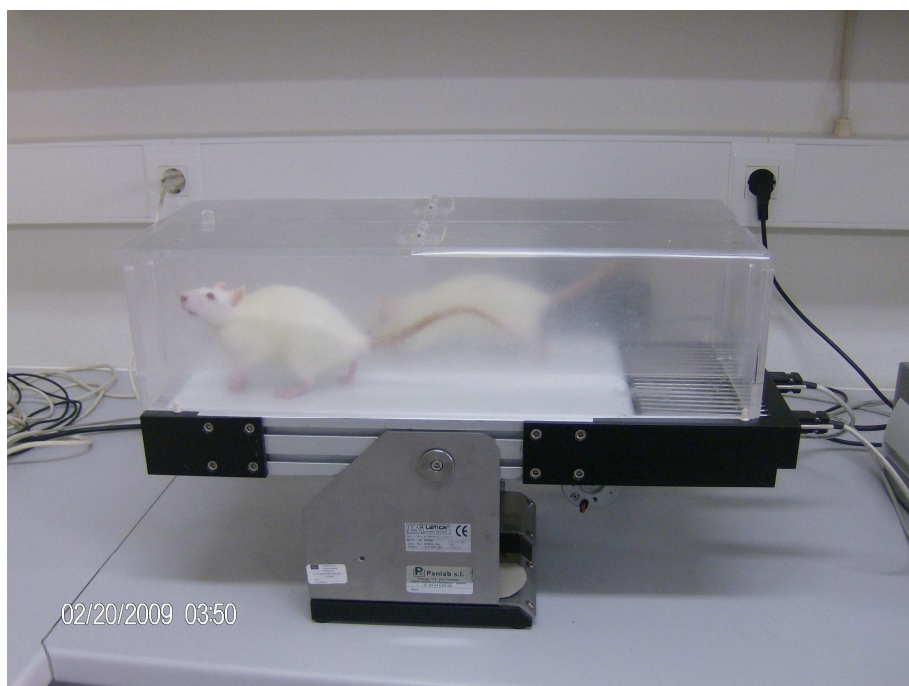


Figura 6- A figura mostra dois animais a serem exercitados no tapete rolante de acordo com o protocolo descrito nesta secção.

O tapete rolante (Leticia Scientific Instruments) é composto por duas passadeiras onde podem correr dois animais de cada vez (Figura 6). A inclinação da passadeira pode ser ajustável, nas primeiras sessões o treino foi efectuado com as passadeiras com 0° de inclinação e a partir da sessão 30 ajustaram-se para 15° de inclinação. Na rectaguarda da passadeira existe uma grelha metálica que se encontra ligada a uma corrente eléctrica

cuja intensidade varia entre 0 mA e 2 mA, na primeira sessão os ratos são colocados na passadeira e a intensidade da corrente vai sendo progressivamente aumentada até ser detectada por eles. O intuito desta grelha é para que os ratos se mantenham a correr na passadeira e não fiquem parados. Todo este sistema está ligado a um computador com um software específico instalado (SeDaCom 32, Letica's device), que recolhe as informações relativas ao treino (tempo e velocidade do treino, número e duração de choques apanhados no decorrer do treino).

Tabela I- Protocolo de exercício do grupo II (animais treinado durante oito semanas).

Semana de treino	Velocidade máxima (cm.s⁻¹/m.min⁻¹)	Tempo à velocidade máxima (min.)	Tempo da sessão (min)	Inclinação da passadeira (graus)
1^a	15 / 25,5	10	12	0
2^a	20 / 34	12	14	0
3^a	35 / 59,5	15	20	0
4^a	50 / 85	5	35	0
5^a	50 / 85	10	40	0
6^a	54 / 91,8	30	50	15
7^a	54 / 91,8	50	52	15
8^a	54 / 91,8	50	52	15

No último dia antes do sacrifício todos os ratos, inclusive os do grupo controlo, foram submetidos a um teste de velocidade máxima de forma a verificar a eficácia do protocolo de treino.

O teste máximo é realizado com uma inclinação de 15°. Efectua-se um pequeno período de adaptação durante 4 minutos a uma velocidade baixa. Seguidamente inicia-se o teste a uma velocidade de 25cm/s durante 4 minutos. **A cada 4 minutos** aumenta-se a velocidade **em 10cm/s**. O teste termina quando o rato atinge a exaustão.

3.3 Sacrifício dos animais

Com o intuito de fazer um maior aproveitamento dos animais em estudo, foram executados conjuntamente vários procedimentos necessários para outros projectos a decorrer em simultâneo no nosso grupo de trabalho. Por tal motivo, antes de sacrificarmos os animais foram colhidas amostras de sangue venoso. De modo a executar esta técnica os animais são previamente anestesiados com uma solução de Ketalar (cetamina) e Largactil (clorpromazina) numa proporção de 2 para 1 respectivamente. A anestesia foi efectuada por via intraperitoneal. A quantidade de anestésico administrada a cada rato foi de 125 mg/Kg.

Após as colheitas de sangue, os animais foram sacrificados com uma sobredosagem do anestésico usado anteriormente e também por via intraperitoneal.

3.4 Colheita dos músculos

Após o sacrifício dos animais iniciou-se a colheita dos músculos: *soleus* e *gastrocnemius*, que são compostos por diferentes tipos de fibras musculares, um possui essencialmente fibras do tipo lento (*soleus*), outro possui mais fibras do tipo rápido (*gastrocnemius*).

Os músculos esqueléticos foram excisados para serem processados o mais rápido possível. É necessário remover a pele que reveste os músculos, faz-se uma incisão através da pele a meio do dorso, ao nível do abdómen, a incisão não deve ser muito profunda, só o suficiente para chegar ao tecido conjuntivo, prolonga-se a incisão até à ponta das patas e afastam-se os bordos da pele com umas pinças. Antes de tentar identificar os músculos que nos interessam deve-se remover cuidadosamente a gordura e o tecido conjuntivo adjacentes, uma vez identificados os bordos dos diferentes músculos podem separar-se uns dos outros com a ajuda de pinças para romper a ligação das fibras de tecido conjuntivo que mantém os músculos unidos (Walker e Homberger, 1997), os tendões serão cortados perto do tecido muscular. Em seguida colhem-se pequenas amostras da parte central do músculo.

Uma amostra de cada músculo da perna direita, foi congelada em isopentano arrefecido em azoto líquido a -160°C para estudos histoenzimológicos (Wang e Kernell, 2001). Estas amostras são depois guardadas numa arca congeladora a -80°C até as análises

serem processadas. Os músculos da perna esquerda foram congelados imediatamente em azoto líquido, após serem excisados, e conservados numa arca congeladora a -80°C até poderem ser efectuadas as análises por Western Blot.

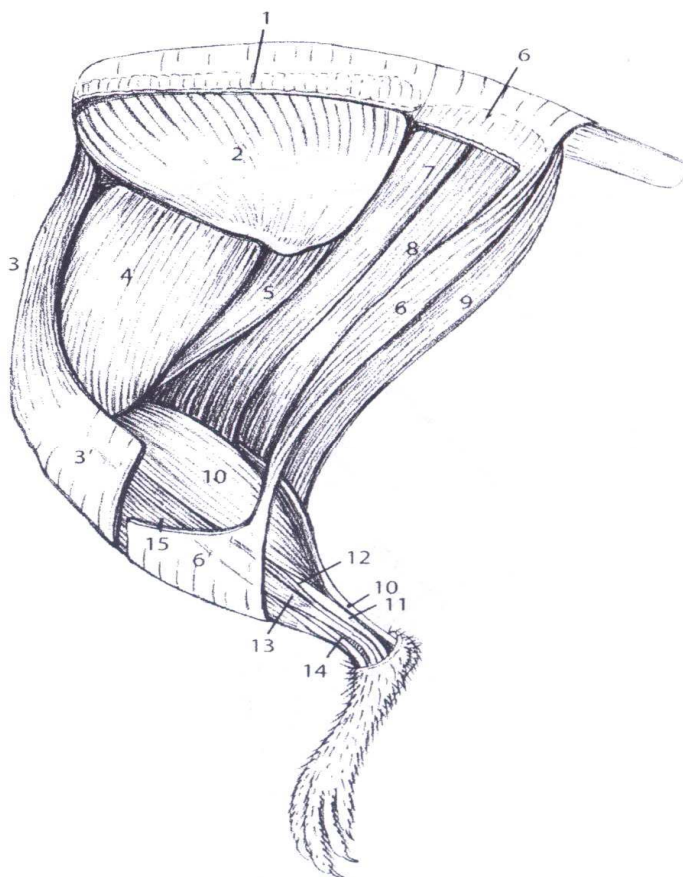


Figura 7- Modelo esquemático dos músculos da pata traseira do rato. Os que vão ser estudados neste trabalho são: o *gastrocnemius* (10) e o *soleus* (12). Adaptado do livro **The laboratory mouse**.

3.5 Estudos histoenzimológicos

A histoenzimologia tem como objectivo demonstrar a actividade enzimática presente num tecido. Os métodos mais comuns de fixação, como por exemplo o formaldeído a 10%, não conseguem preservar a actividade enzimática, esta actividade existe nos tecidos vivos e cessa imediatamente após a morte celular. O método ideal de fixação para realizar estudos histoenzimológicos é a criosubstituição, que consiste em substituir

a água do tecido por um líquido, que neste caso é o isopentano, a muito baixa temperatura (160°C negativos) em azoto líquido (Garcia del Moral, 1993). Os cortes histológicos foram efectuados num crióstato a -24°C e tinham uma espessura de 8µm em corte transversal. As análises histoenzimológicas vão identificar as desidrogenases nas fibras do tipo I (NADH diaforase, succinodesidrogenase e lactodesidrogenase) e da ATPase a diferentes pH para diferenciar as fibras do tipo I e também as distintas classes de fibras do tipoII (Jiang 1992).

Neste estudo foi efectuado o método das ATPases a diferentes pH, que detecta fibras musculares de contração lenta ou rápida. O primeiro passo neste método consiste numa pré-incubação com uma solução ácida (pH=4) e outra com uma solução básica (pH=9,35). A pré-incubação na solução ácida inibe a actividade das ATPases nas fibras do tipo rápido (tipo II) mas não nas lentas (tipo I) que coram de castanho ou preto, ao contrário a pré-incubação na solução básica inibe as ATPases nas fibras do tipo lento mas coram de escuro as fibras do tipo rápido (Delp *et al.*, 1997; Hamalamein e Pette, 1993).

3.6 Expressão genética das isoformas da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS)

Após a obtenção do tecido muscular esquelético, este foi lavado numa solução salina (PBS) e colocado numa solução de lise a 4°C [Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 140 mM; EDTA 20 mM; Glicerol 10%; NP-40 1%; PMSF 2 mM]. A mistura foi colocada num homegeneizador até o tecido se encontrar completamente homogéneo como o tampão de lise. Durante este processo foi adicionado um cocktail de inibidores de proteases (Kit comercial, Merck). Após a homogeneização as amostras foram colocadas a 4°C durante 30 minutos. Decorrida a incubação as amostras foram centrifugadas a 10 000xg (4°C) durante 30 minutos.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bardford (1976). As amostras (100 – 150 µg de proteína por carril) foram misturadas com igual volume de tampão de carga (2-β-mercaptoetanol 10%; SDS; 4%; glicerol 20%, azul de bromofenol 0,05%, Tris 125 mM, pH 6,8) e separadas por electroforese num gel de poliacrilamida-SDS (laemmli, 1970).

Condições de electroforese: O gel de poliacrilamida-SDS foi preparado com uma espessura de 1,5 mm a 6%. Para a preparação do gel foi utilizado um pente de 10

orifícios. A electroforese foi realizada num sistema Bio-Rad a uma voltagem constante de 80 a 100 V.

O gel obtido na electroforese foi seguidamente transferido para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando-se um tampão que continha Tris 20 mM e glicina 190 mM, pH 8,4 – 8,8, num sistema de electroforese com corrente constante (400-450 mA). A membrana foi bloqueada durante toda a noite com um tampão padrão (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM e Twin-20 0,1%, pH 7,5-8,0) ao qual foi adicionada albumina a 3%.

Seguidamente a membrana foi incubada durante 60 minutos, sob agitação, no tampão padrão que continha o anti-corpo primário policlonal (anti-coelho) na diluição óptima de 1:1000 (Santa Cruz). Foram realizadas quatro lavagens de 10 minutos cada, na mesma solução e sob agitação. Após este procedimento adicionou-se o anti-corpo secundário policlonal com peroxidase de rábano (1:10 000) (Bio-Rad) e incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente. Fizeram-se outras quatro lavagens com o mesmo tampão e sob agitação. Seguidamente a membrana foi revelada utilizando um método quimioluminescente não radioactivo (ECL, Amersham) em película fotográfica.

4. Resultados

4.1 Peso dos animais

Tendo em conta que o sedentarismo aumenta a quantidade de gordura corporal e que o exercício físico aeróbio, reduz a percentagem corporal de gordura e aumenta a massa muscular, o peso de todos os animais foi controlado no início, durante e após a experiência. Os resultados obtidos para o grupo de animais treinados e respectivo controlo pode ser analisado no gráfico 1.

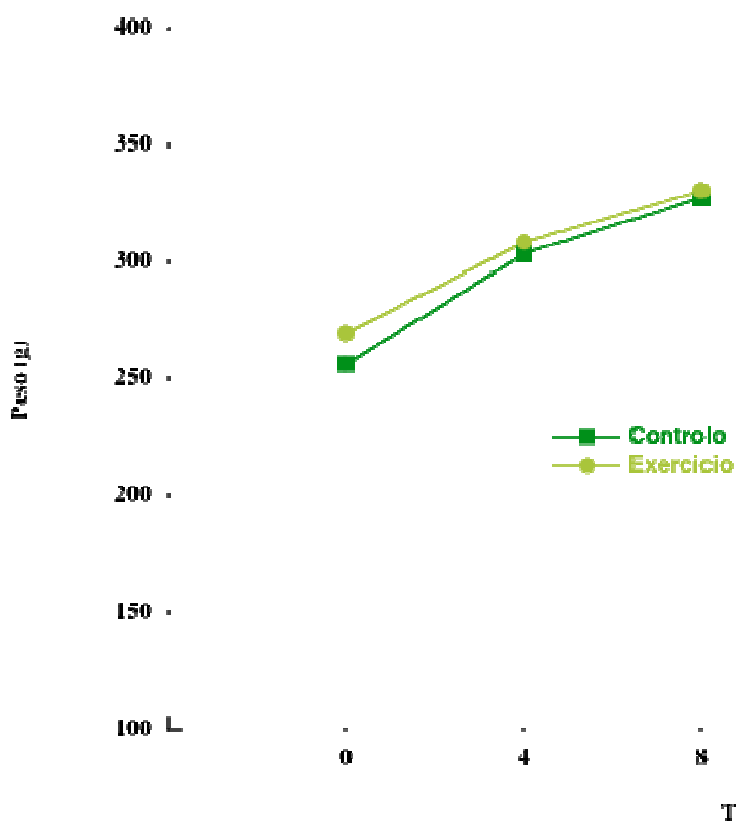


Gráfico 1- pesos dos animais em estudo. Controlo (n=5)- grupo de animais sem treino; exercício (n=8)- animais sujeitos a exercício aeróbio durante oito semanas em tapete rolante (como descrito na secção de metodologia). Cada símbolo representa a média dos valores e as linhas verticais o erro padrão.

Esta análise permite-nos verificar que não houve alterações de peso entre os dois grupos durante as oito semanas de treino. Tanto o grupo de ratos controlo (verde escuro) como o grupo de ratos exercitado (verde claro) aumentaram progressivamente o seu peso ao longo das oito semanas de experiência.

4.2 Teste de velocidade máxima

Após o treino de oito semanas era importante verificar o estado de preparação física de ambos os grupos de ratos (treinados e controlo). Para tal foi realizado um teste de velocidade máxima de acordo com o proposto por Eliakim *et al.* (1997).

O teste de velocidade máxima efectuado no último dia de treino, após as oito semanas, mostrou diferenças significativas entre os dois grupos de ratos. Como se pode observar no gráfico 2, o grupo submetido a exercício durante as oito semanas permaneceu mais tempo no tapete rolante. O gráfico 3 mostra que a velocidade atingida pelos ratos exercitados foi também maior do que no grupo controlo.

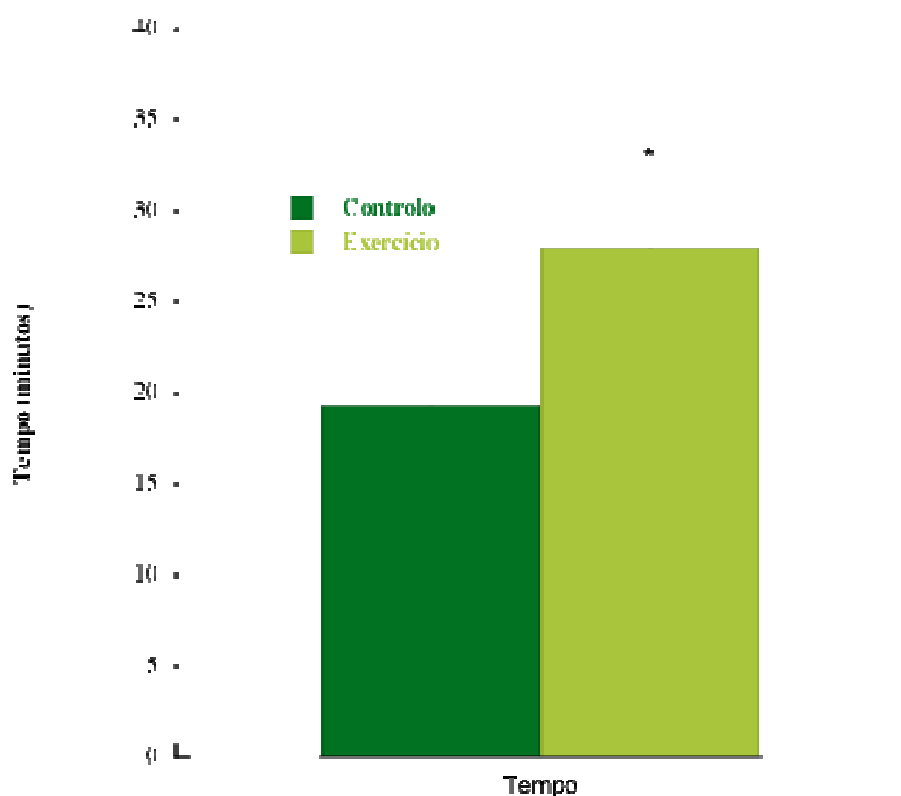


Gráfico 2- Tempo de duração do teste de velocidade/resistência, em minutos. As barras representam médias dos tempos realizados pelos animais controlo (n=5) e animais exercitados (n=8). As linhas verticais representam o erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controlo.

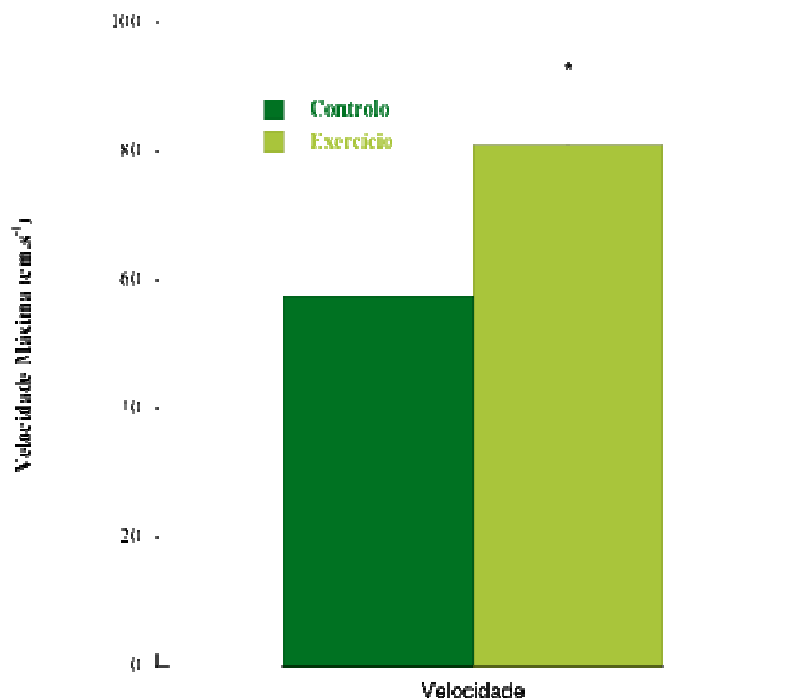


Gráfico 3- Velocidade máxima atingida (cm.s^{-1}) durante o teste de velocidade/resistência. As barras representam médias e as linhas verticais o erro padrão das velocidades atingidas pelo grupo controle ($n=5$) e pelo grupo exercitado ($n=8$). * $p < 0,05$ relativamente ao grupo controle.

4.3 Análise macroscópica dos músculos

O aspecto macroscópico dos músculos esqueléticos, quando foi efectuada a colheita, mostrava uma diferença substancial entre os animais exercitados e os que não tinham sido submetidos a nenhum tipo de exercício. A gordura que os rodeava era menor no grupo exercitado e a sua definição era muito maior neste mesmo grupo, conseguindo-se fazer uma separação mais rápida dos músculos do grupo submetido a exercício devido à sua nitidez.

4.4 Análise histoenzimológica

A análise histoenzimológica permitiu-nos efectuar a contagem das fibras dos vários tipos (lentas e rápidas) em cada um dos músculos com e sem exercício. Um exemplo das imagens obtidas a pH 9,35 pode ser observado na figura 8.

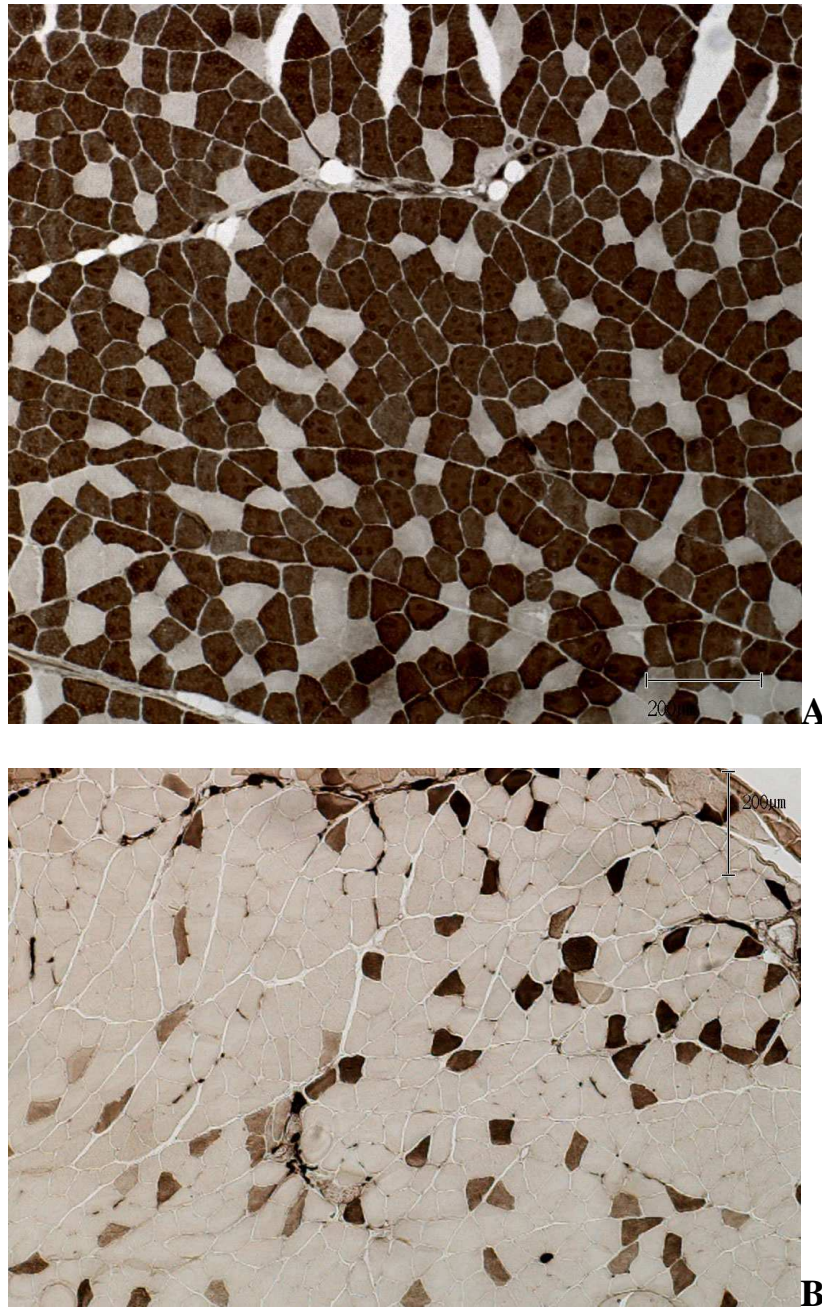


Figura 8- Exemplo das análise enzimática (ATPase) dos músculos *gastrocnemius medialis* (A) e *soleus* (B), onde se podem ver as fibras tipo I marcadas a branco e as fibras tipo II a castanho escuro.

Da análise da percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas do tipo I e do tipo II no músculo *soleus*, verificou-se um aumento significativo das fibras do tipo I para quase 100% no grupo exercitado em relação ao grupo controlo, o qual tinha cerca de 65% de fibras do tipo I e 35% de fibras do tipo II (Gráfico 4). A contagem foi efectuada em campos fixos com mais de 500 fibras, sempre pelo mesmo observador e com um mínimo de três repetições.

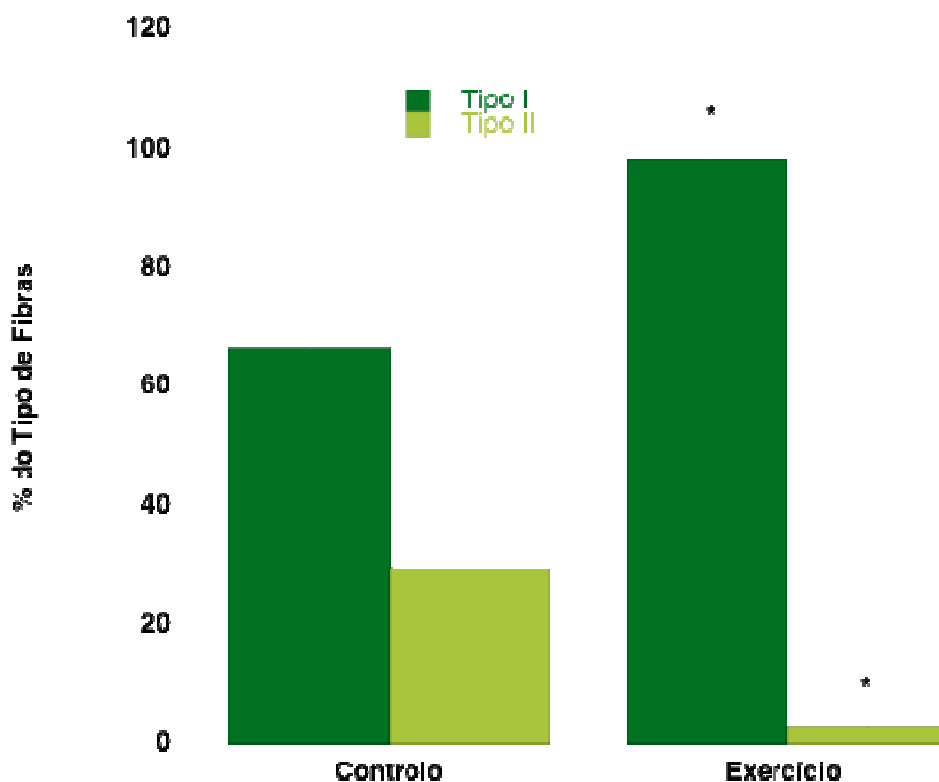


Gráfico 4- Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo *soleus* dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num mínimo de 500 fibras.

Como foi referido anteriormente, e pode ser atestado pela foto 8, o músculo *gastrocnemius* tem uma predominância de fibras do tipo II. É esta predominância que é comprovada pela contagem das fibras. De facto, na análise da percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas do tipo I e do tipo II no músculo *gastrocnemius* verificou-se haver uma dominância de fibras do tipo II (Gráfico 5). Após o exercício, e contrariamente ao que ocorreu no músculo *soleus*, não há alteração do tipo de fibras (Gráfico 5). Há, porém, uma tendência para uma descompensação entre os dois tipos de fibras (I e II).

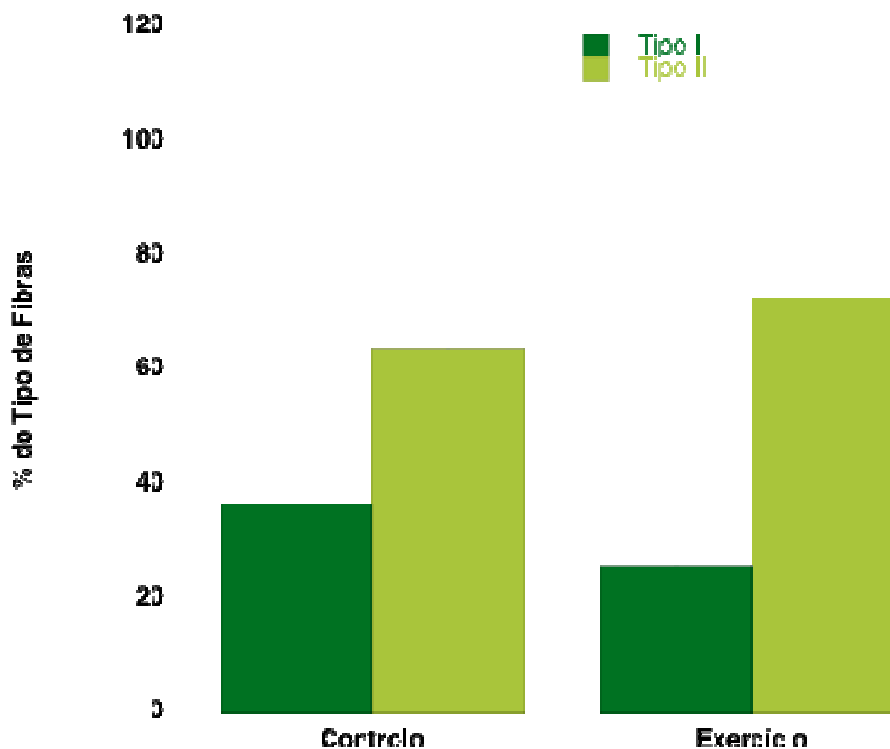


Gráfico 5- Percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas tipo I e tipo II no músculo *gastrocnemius lateralis* dos ratos em estudo (controlo vs exercício). As fibras foram contadas em fotos digitalizadas num campo fixo. A contagem foi efectuada três vezes num mínimo de 500 fibras.

4.5 Análise histológica

4.5.1 Músculo *soleus*

As alterações morfológicas, observadas nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina, no músculo soleus dos ratos exercitados são: fibrose intersticial, com algum tempo de evolução; aparecimento de células de menor diâmetro, possivelmente células em formação, com citoplasma hiperacorado, evidenciando actividade mitocondrial intensa.

A observação dos músculos dos ratos controlo mostrou fibras de forma poligonal e tamanho mais regular, isto é, com pouca variação de tamanho, sem fibrose intersticial e células em mosaico, justapostas, que constitui o padrão normal das fibras musculares

em corte transversal. Um exemplo das alterações referidas pode ser visualizado na Figura 10.

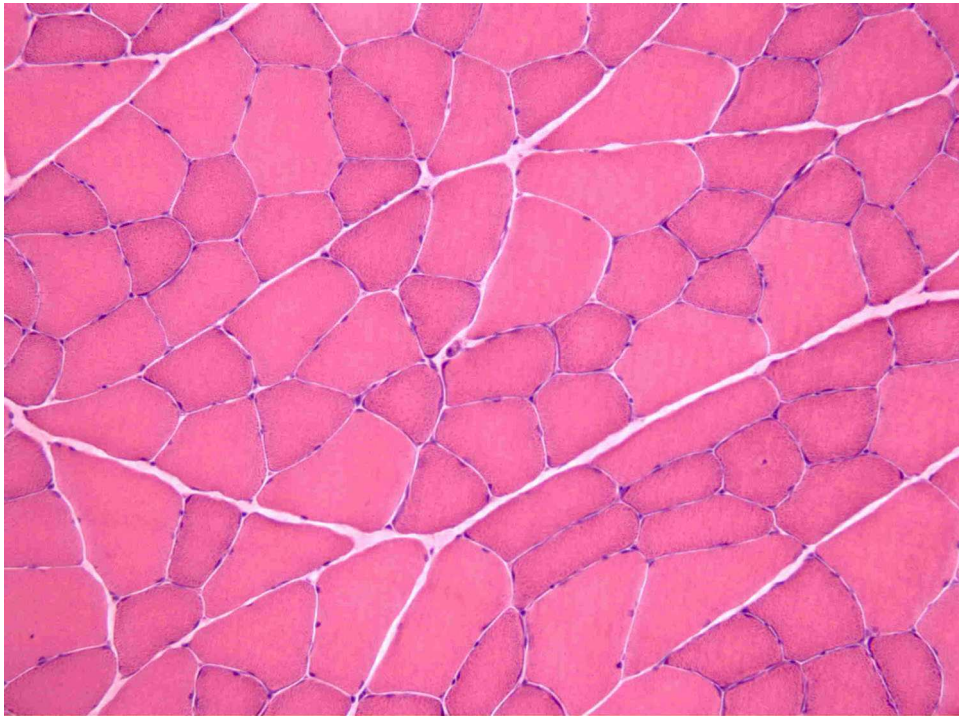


Figura 9- Corte transversal de músculo esquelético de rato controle. Podem ver-se o padrão normal das fibras musculares. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina-Eosina.

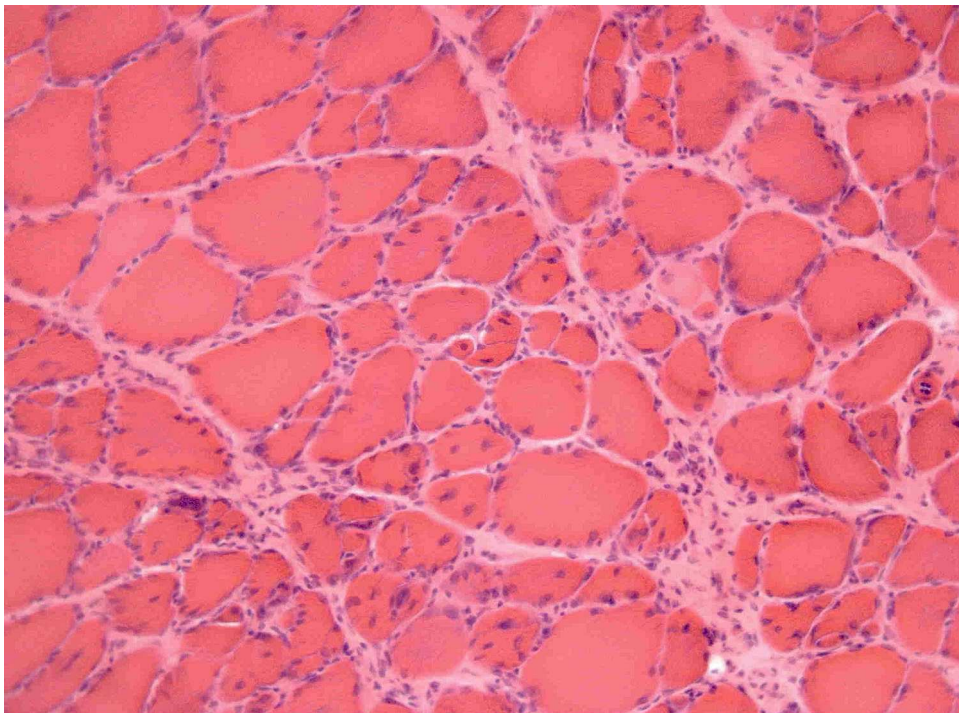


Figura 10- Corte transversal do músculo *soleus* de ratos treinados durante oito semanas. Pode ver-se alguma fibrose intersticial, células com núcleo central, várias células de pequeno tamanho que sugerem células em formação. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina-Eosina.

4.5.2 Músculo *gastrocnemius*

As alterações morfológicas, observadas no músculo *gastrocnemius* dos ratos exercitados são: atrofia; núcleos centrais; basofilia; células em necrose e variabilidade do tamanho celular. Podem ver-se ainda algumas células hipercontraídas o que não tem significado patológico (Figura 11).

Os músculos dos ratos do grupo controlo apresentam uma maior uniformidade no tamanho das fibras, não se observa fibrose intersticial ou células em necrose, as fibras apresentam um aspecto de mosaico, mais justapostas (figura 9).

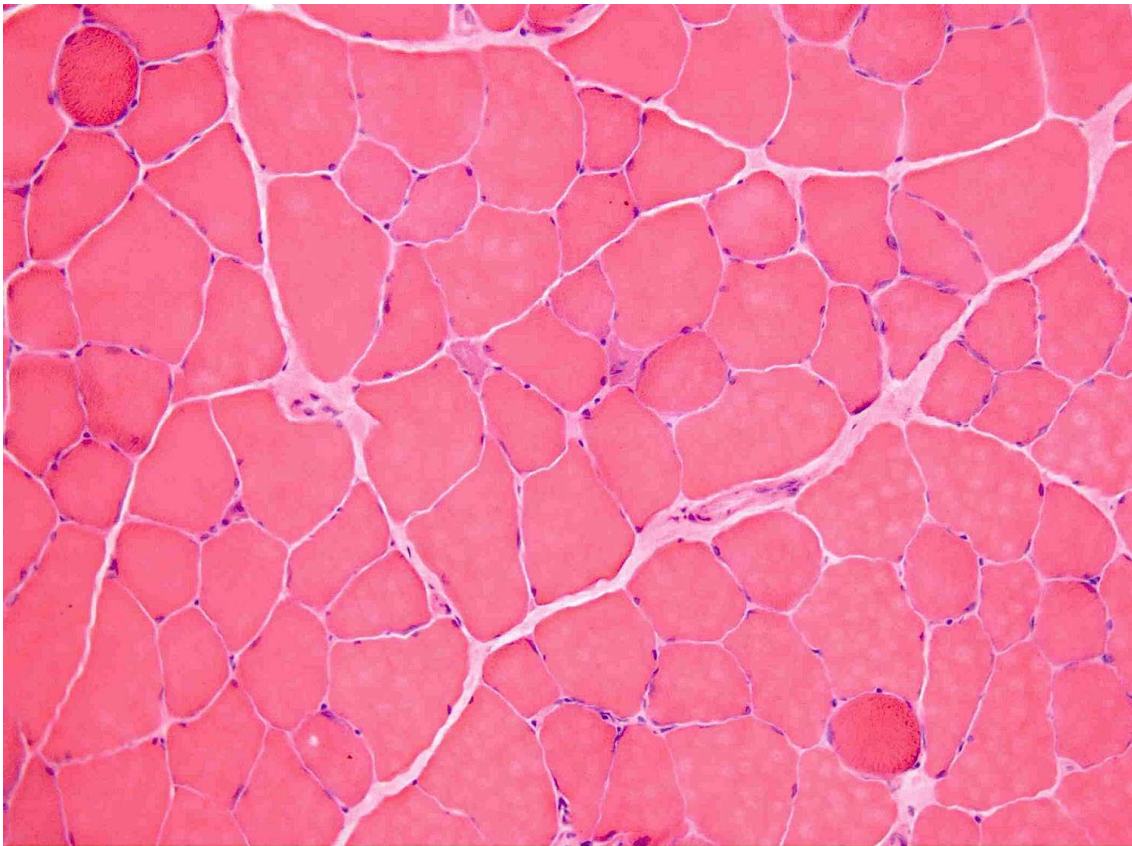


Figura 11- Corte transversal do músculo *gastrocnemius* de ratos treinados durante oito semanas. Pode ver-se algumas células em necrose, várias células hipercontraídas. Ampliação 200x; corante: Hematoxilina-Eosina.

4.6.1 Expressão da cNOS

A densidade relativa da expressão da cNOS aumenta no grupo exercitado em relação ao grupo controlo, mas esse aumento só é significativo no músculo *soleus*, no qual há um aumento de 65% para cerca de 80%, no músculo *gastrocnemius* essa diferença é mínima, aumenta de 60% para 63%, não tendo qualquer significado (gráfico 6).

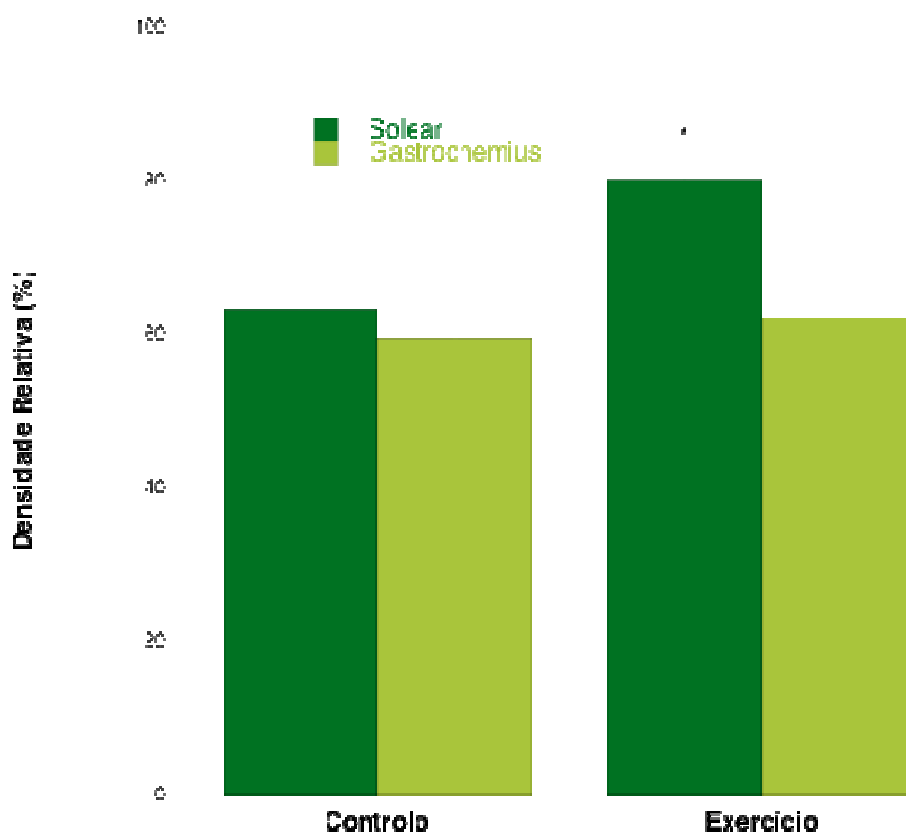


Gráfico 6- Densidade relativa (%) da expressão da cNOS nos dois músculos em estudo.
* $p < 0,05$ relativamente ao grupo controlo.

4.6.2 Expressão da iNOS

No grupo controlo a densidade relativa da expressão da iNOS no músculo *soleus* é menor do que no músculo *gastrocnemius*. Após o treino verificámos um aumento da expressão relativa da iNOS no músculo *soleus* e nenhuma alteração no músculo *gastrocnemius* (gráfico 7).

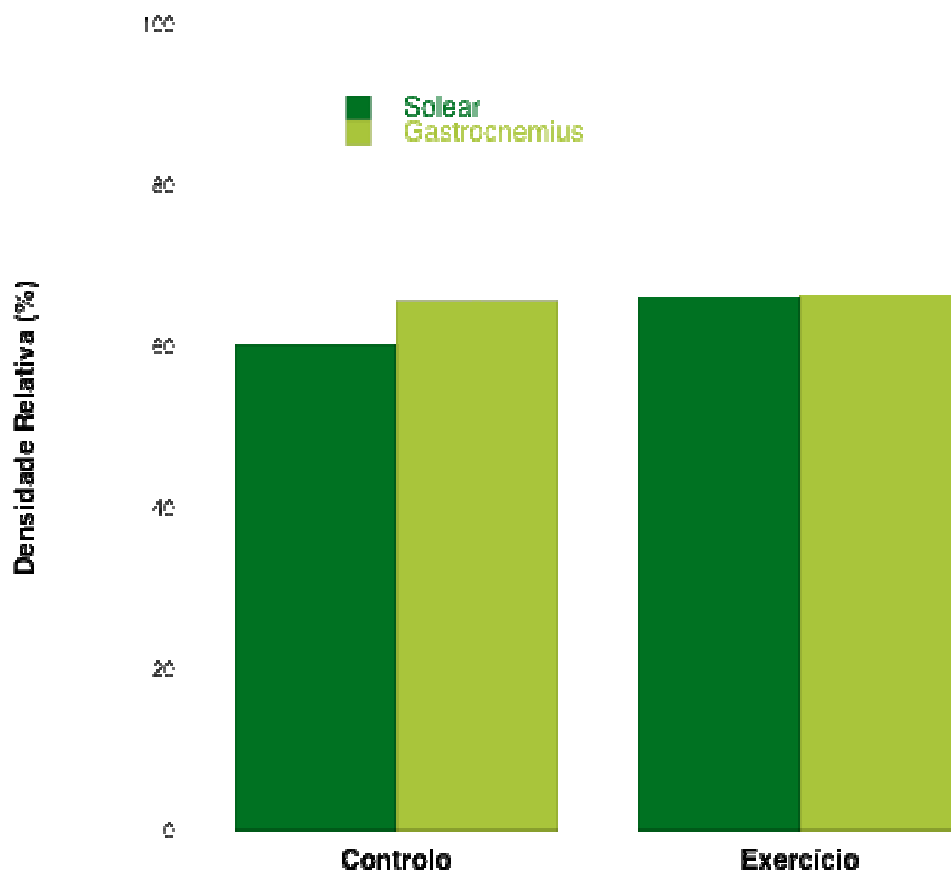


Gráfico 7- Densidade relativa (%) da expressão da iNOS nos dois músculos em estudo. * $p < 0,05$ relativamente ao grupo controlo.

5. Discussão

O objectivo deste estudo foi o de determinar as alterações dos tipos de fibras musculares e das enzimas NO sintetase (NOS), com o exercício aeróbio, no músculo *soleus* e no *gastrocnemius* do rato Wistar, e comparar as duas alterações (tipo de fibras e NOS). Para testar a eficácia do treino efectuado, no final das oito semanas de treino fez-se a todos os ratos, tanto os exercitados como os controlo (ratos não submetidos a exercício aeróbio), um teste de velocidade máxima. Esse teste mostrou que o treino efectuado foi eficaz, uma vez que os animais exercitados conseguiram atingir uma velocidade superior, e 40% de tempo a mais no tapete rolante, do que os ratos controlo.

O protocolo de exercício escolhido para este estudo está de acordo com outros estudos que demonstraram que é necessário uma duração mínima de exercício (mais de 30 minutos/dia) durante pelo menos oito semanas, para se verificarem alterações no fenótipo das isoformas de miosina e no aumento dos parâmetros da actividade enzimática (Demirel *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2009).

A variação do peso dos animais em estudo foi homogénia, no final das oito semanas, a média dos pesos nos dois grupos era igual. Estes números estão de acordo com o estudo de Chow *et al* (2007) que também verificou que não havia variação significativa entre os pesos corporais dos animais exercitados e não exercitados. No entanto o mesmo estudo verificou que houve uma redução significativa na percentagem de gordura abdominal (-25,4%; $p < 0,02$) e uma redução na percentagem da gordura total do animal (-19,5%; $p < 0,01$). No nosso estudo não pesámos a gordura corporal, mas na observação macroscópica dos ratos, quando se fez a colheita dos órgãos e dos músculos, pôde observar-se que em redor das vísceras e na pele subcutânea que rodeava as patas traseiras dos ratos não exercitados, havia muita gordura.

O exercício aeróbio é responsável pela alteração do tipo de fibras musculares esqueléticas do tipo rápido (tipo II) para o tipo lento (tipo I) (Bigard *et al.*, 1996; Demirel *et al.*, 1999; Fitzsimons *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 2009; Roels *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2000).

Neste estudo os resultados histoenzimológicos do músculo *soleus* confirmam que há um aumento significativo das fibras do tipo I, para quase 100% no grupo exercitado em relação ao grupo sem nenhum tipo de exercício, o qual tinha cerca de 65% de fibras do

tipo I e 35% de fibras do tipo II. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Demirel *et al* (1999) que verificou um aumento das isoformas de miosina das cadeias pesadas (MHC) do tipo I em relação às do tipo II.

Na análise da percentagem relativa das fibras musculares esqueléticas do tipo I e do tipo II no músculo *gastrocnemius* verificou-se um aumento de fibras do tipo II em detrimento das fibras do tipo I, no grupo exercitado em relação ao grupo controlo, mas este aumento não é significativo. No estudo de Fitzsimons *et al.* (1990) sobre as isoformas da miosina em diferentes músculos também se confirmaram estes resultados, não houve alteração das percentagens das isoformas da miosina do tipo rápido para o tipo lento no músculo *gastrocnemius*. O motivo de neste músculo não haver uma mudança de fibras do tipo rápido para o tipo lento pode talvez, ser explicado pelo facto da percentagem de fibras rápidas no *gastrocnemius* ser muito alta. E também por as fibras do tipo rápido não terem tantas células satélite como as fibras do tipo lento, uma vez que se sabe que a transição das fibras rápidas em fibras lentas está associada ao aumento das células satélite (Martins *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO) está implicado numa série de processos fisiológicos (Khanna *et al.*, 2004). O músculo esquelético contém a maior fonte de NO de todo o corpo, sendo a isoforma nNOS a mais abundante, e alterações na sua sinalização pode implicar uma mudança no funcionamento normal do músculo esquelético (Jingying *et al.*, 2004). Uma das funções do NO é a activação das células satélite que são responsáveis pela regeneração das fibras musculares (Cramer *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2009; Tatsumi *et al.*, 2005). A actividade da nNOS aumenta com o exercício, devido às contracções musculares, e a eNOS também aumenta devido ao aumento da corrente sanguínea provocado pelo stress do exercício e pelo maior recrutamento das mitocôndrias, às quais esta enzima (eNOS) está associada (Mielkiewicz *et al.*, 2005).

Neste estudo a densidade relativa da expressão da cNOS aumenta no grupo exercitado em relação ao grupo controlo, mas esse aumento só é significativo no músculo *soleus*, no qual há um aumento de 65% para cerca de 80%. No músculo *gastrocnemius* essa diferença é mínima, aumenta de 60% para 63%, não sendo, por isso, um aumento significativo. No estudo de Tidball *et al.* (1998) também se verificou um aumento de cNOS em culturas de fibras musculares *in vitro*. No estudo de Jingying *et al.* (2004), com células do músculo esquelético em cultura, verificou-se um aumento da expressão da enzima nNOS durante a formação de células multinucleadas.

O aumento da expressão da iNOS no músculo *soleus* sujeito a exercício corresponde a um aumento de fibras do tipo I desse mesmo músculo. Uma vez que a iNOS está envolvida nos mecanismos da necrose, e foram encontradas células em necrose no grupo exercitado, podemos sugerir que a iNOS induz a necrose das fibras do tipo II para mais tarde aparecerem fibras do tipo I, isto no músculo *soleus* (Rudnick *et al.*, 2004). O estudo de Cramer *et al.* (2004) não apresentou células em necrose após exercício excêntrico, apesar de mostrar aumento de células satélite, mas a duração foi de apenas uma sessão e os indivíduos estudados eram humanos e não animais.

Comparando o tipo de fibras e a variação das NOS constitutivas (cNOS), verificou-se que a cNOS aumentou no músculo *soleus* sujeito a exercício aeróbio, durante oito semanas, tal como o número de fibras do tipo I, sugerindo que pode haver uma correlação entre o aumento das fibras do tipo I e o aumento da actividade da cNOS. O aumento da cNOS e da iNOS no músculo *soleus*, é consistente com os resultados encontrados na literatura (Harris *et al.*, 2008).

No músculo *gastrocnemius* há um aumento das fibras do tipo II que não é significativo e a expressão da cNOS e da iNOS mantêm-se praticamente inalterada, sugerindo não haver relação entre o aumento das fibras do tipo II e a actividade das NOS constitutivas e indutíveis.

6. Conclusão

Com este estudo podemos concluir que o exercício aeróbio provoca alterações significativas no tipo de fibras musculares do músculo esquelético *soleus*, após oito semanas de treino, e que a expressão das NOS acompanha estas alterações. No caso do músculo *soleus*, observou-se um aumento tanto das isoformas constitutivas de NOS (cNOS) como da isoforma indutiva (iNOS) assim como um aumento das fibras do tipo I. A isoforma nNOS está associada às células satélite, e estas por sua vez encontram-se em maior número nas fibras do tipo I, o que indica que o nNOS pode ser um dos mecanismos que influencia o tipo de fibra existente em cada músculo. A isoforma eNOS também aumentou tal como as fibras do tipo I e isso está de acordo com a sua função e localização, pois há medida que aumentam as fibras do tipo I também aumenta o número de microvasos para compensar a maior necessidade de fornecimento de oxigénio. O motivo do aumento da isoforma iNOS parece estar relacionado com a necessidade das células entrarem em necrose para que outras surjam, neste caso é necessário que morram as células do tipo II para que apareçam posteriormente células do tipo I. Na observação que fizemos das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina podemos verificar que haviam células em necrose e novas células a surgir, após oito semanas de exercício. Num trabalho futuro gostaríamos de verificar se haveria outras células com marcação positiva para a apoptose. Ao contrário do que outros estudos propõem, de que há uma transformação das células do tipo II em tipo I, é nosso entendimento que quando o músculo é requisitado para dar outro tipo de resposta em função de novas tarefas, tem que haver morte das fibras que já não dão resposta ao que lhes é pedido pelo organismo para que apareçam novas fibras do tipo necessário. Quanto às alterações morfológicas do tecido muscular, são visíveis tanto nas fibras do músculo *soleus* como no *gastrocnemius*, o que sugere que a expressão da enzima NOS não está relacionada com as alterações estruturais, uma vez que o aumento da expressão da enzima NOS só se verifica no músculo *soleus* exercitado.

7. Bibliografia

- Adams GR, Cheng DC, Haddad F, Baldwin KM. **Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration.** J Appl Physiol, 96: 1613-1618. 2004.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. **Review article. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition.** Biochem J, 357: 593-615. 2001.
- Ali MA. **Myotube formation in skeletal muscle regeneration.** J. Anat. 128, 3, 553-562. 1979.
- Anderson JE. **A Role for Nitric Oxide in Muscle Repair: Nitric Oxide-mediated Activation of Muscle Satellite Cells.** Molecular Biology of the Cell. Vol. 11, 1859-1874, May 2000.
- Arias EB, Gosselin LE, Cartee GD. **Exercise training eliminates age-related differences in skeletal muscle insulin receptor and IRS-1 abundance in rats.** J.Gerontology: Biological Sciences, Vol. 56A, N° 10: B449-B455. 2001.
- Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. **Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease.** Physiol Rev. Vol 80. N°3:1215-1265. 2000.
- Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. **Fisiologia.** 5ª edição. Mosby-Elsevier Editora Lda. 2004.
- Boonyarom O, Inui K. **Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects.** Acta Physiologica, 188: 77-89. 2006.
- Bradford MM. **A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem 72: 248- 254, 1976.
- Brooke MH, Kaiser KK. **Muscle fiber types: how many and what kind?** Arch Neurol, Vol 23: 369-379.1970.

- Chargé SBP, Rudnicki MA. **Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.** *Physiological Reviews*, 84: 209-238. 2004.

- Chow LS, Greenlund LJ, ASmann YW, Short KR, McCrady SK, Levine JA, Nair KS. **Impact of endurance training on murine spontaneous activity, muscle mitochondrial DNA abundance, gene transcripts, and function.** *J Appl Physiol*, 102: 1078-1089. 2007.

- Cramer RM et al. **Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise.** *J Physiol*; 558.1: 333-340. 2004.

- Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI. **Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure.** *J Appl Physiol*.83:1291-1299. 1997.

- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS. **Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship.** *J Appl Physiol* 86:1002-1008. 1999.

- Denadai BS, Caputo F. **Efeitos do treinamento sobre a cinética do consumo de oxigênio durante o exercício realizado nos diferentes domínios de intensidade de esforço.** *Revista Motriz*, Vol.9, n.1 (supl.), p.S1-S7. 2003.

- Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL. **Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle.** *J Appl Physiol*, 53 (4): 844-850. 1982.

- Durante PE, Mustard KJ, Park SH, Winder WW, Hardie DG. **Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles.** *AM J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E178-E186. 2002.

- Eliakim A, Moromisato M, Moromisato D, Brasel JA, Roberts Jr C, Cooper DM. **Increase in muscle IGF-I protein but not IGF-I mRNA after 5 days of endurance training in young rats.** *Am J Physiol* 273: R1557-R1561, 1997.

- Ferguson C, Whipp BJ, Cathcart AJ, Rossiter HB, Turner AP, Ward SA. **Effects of prior very-heavy intensity exercise on indices of aerobic function and high-intensity exercise tolerance.** *J Appl Physiol*, 103: 812-822. 2007.

- Fewell JG et al.. **A treadmill exercise regimen for identifying cardiovascular phenotypes in transgenic mice.** Special communication, The American Physiological Society, 1997.

- Fitts RH. **Cellular mechanisms of muscle fatigue.** Physiological Reviews. Vol 74, Nº1: 49-94. 1994.

- Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, Unsworth BR. **Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization.** J Appl Physiol, 60: 1946-1953. 1986.

- Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. **Physiology of a microgravity environment. Invited review: microgravity and skeletal muscle.** J Appl Physiol, 89: 823-839. 2000.

- Fitzsimons DP, Difeee GM, Herrick RE, Baldwin KM. **Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles.** J Appl Physiol. 68 (5): 1950-1955. 1990.

- Flora Filho R, Zilberstein B. **Artigo de Revisão. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções.** Rev Ass Med Brasil; 46(3): 265-71. 2000.

- Forstermann U, Boissel J, Kleinert H. **Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).** Faseb J, 12:773-790. 1998.

- Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y. **Localization of Nitric Oxide Synthase in Human Skeletal Muscle.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 227: 88–93. 1996.

- Frimel TN, PhD, Kapadia F, MHS, Gaidosh GS, BA, Li Y, BS, Walter GA, PhD, Vandenborne K, PhD. **A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice.** Muscle and nerve, 32: 672-674. 2005.

- Garcia del Moral, R.; **Laboratório de Anatomia Patológica;** McGraw-Hill-Interamericana de Espanha, Madrid. 1993.

- Glass DJ. **Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** Nature Cell Biology, 5: 87-90. 2003.

- Glass DJ. **Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37: 1974-1984. 2005.

- Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. **Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 37: 1473-1480. 2004.
- Guyton AC, Hall JE. **Tratado de fisiologia médica.**Guanabara Koogan. Décima edição. Rio de Janeiro. 2002.

- Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. **Atrophy responses to muscle inactivity. I. Cellular markers of protein deficits.** J Appl Physiol, 95: 781-790. 2003a.
- Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR, Baldwin KM. **Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits.** J Appl Physiol, 95:791-802. 2003b.

- Hamalainen N, Pette D.**The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, ID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat, and Rabbit.** The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol.41.Nº1:733-743. 1993.

- Hans J. Hedrich, Gillian Bullock; **The Laboratory Mouse;** Elsevier Academic Press; 2004.

- Harris MB, Mitchell BM., Sood SG, Webb RC, Venema RC. **Increased nitric oxide synthase activity and Hsp90 association in skeletal muscle following chronic exercise.** Eur J Appl Physiol 104:795–802. 2008.

- Holloszy JO. **Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle.** J Biol Chem. Vol. 242, Nº 9: 2278-2282.1967.

- Jackman RW, Kandarian SC. **The molecular basis of skeletal muscle atrophy.** AJP-Cell Physiology, 287: 834-843. 2004.

- Jiang B, Ohira Y, Roy RR, Nguyen Q, Ilyina-Kakueva EI, Oganov V, Edgerton VR. **Adaptation of fibers in fast-twitch muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension.** J Appl Physiol, 73 (2 Suppl): 58S-65S. 1992.

- Jingying SZ, Kraus EK, Truskey GA. **Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells.** Am J Physiol Cell Physiol.287: 292-299. 2004.

- Jones D, Round J, Haan A. **Skeletal muscle from molecules to movement**. Churchill Livingstone. 2004

- Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10ªedição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

- Khanna A, Prudence BM, Cowled A, Fitridge RA.**Nitric Oxide and Skeletal Muscle Reperfusion Injury: Current Controversies (Research Review)**. Journal of Surgical Research **128**, 98–107.2005.

- Kierszenbaum AL. **Histologia e biologia celular. Uma introdução à patologia**. New York. Elsevier Editora Ltda. 2004.

- Koh TJ, Peterson JM, Pizza FX, Brooks SV.**Passive Stretches Protect Skeletal Muscle of Adult and Old Mice From Lengthening Contraction-Induced Injury**. J Gerontology. Biological Sciences. Vol 58 A. Nº7: 592-597. 2003.

- Koh T J, Tidball J G. **Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle**. Journal of Physiology, 519.1, pp. 189—196.1999.

- Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature 227: 680-685, 1970.

- Launay T, Armand A, Charbonnier F, Mira J, Donsez E, Gallien CL, Chanoine C. **Expression and Neural Control of Myogenic Regulatory Factor Genes During Regeneration of Mouse Soleus**. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol.49 (7):887-899. 2001.

- Lynch GS, Faulkner JA. **Contraction-induced injury to single muscle fibers: velocity of stretch does not influence the force deficit**. Am J Physiol Cell Physiol.275:1548-1554. 1998.

- Martins KJB *et al*.**Satellite cell ablation attenuates short-term fast-to-slow fibre type transformations in rat fast-twitch skeletal muscle**. Pflugers Arch - Eur J Physiol 458:325–335. 2009.

- Martins KJB, Gordon T, Pette D, Dixon WT, Foxcroft GR, McLean IM, Putman CT. **Effect of satellite cell ablation on low-frequency-stimulated fast-to-slow fibre-type transitions in rat skeletal muscle.** J Physiol. 572.1: 281-294. 2006.

- Mathews GG. **Cellular physiology of nerve and muscle.** Edição 4. Blackwell Publishing. 2003.

- McArdle WD, Katch FI, Katch VL. **Essentials of exercise physiology.** Edition 3, page 282. 2005.

- McComas AJ. **Skeletal muscle form and function.** Human Kinetics. 1996.

- McCully KK, Faulkner JA. **Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers.** J Appl Physiol, 61(1):293-299.1986.

- Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. **Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 289: H336-H343. 2005.

- Mehl KA, Davis JM, Berger FG, Carson JA. **Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic *Apc*^{Min/+} mouse.** J Appl Physiol. N.º 99:2379-2387. 2005.

- Parise G, O'Reilly CE, Rudnicki MA. **Molecular regulation of myogenic progenitor populations.** Appl Physiol Nutr Metab 31:773-781. 2006.

- Pette D, Staron RS. **The Molecular Diversity of Mammalian Muscle Fibers.** Int. Union Physiol. Sci./Am. Physiol. Soc. Vol 8:153-157. 1993.

- Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. **Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy.** J Musculoskelet Neuronal Interact; 7(3):208-218. 2007.

- Punkt K *et al.* **Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types.** Histochem Cell Biol 125: 567–573.2006.

- Punkt K, Naupert A, Wellner M, Asmussen G, Schmidt C , Buchwalow IB. **Nitric oxide synthase II in rat skeletal muscles.** Histochem Cell Biol 118:371–379.2002.

- Punkt K, Zaitsev S, Park JK, Wellner M, Buchwalow IB. **Nitric oxide synthase isoforms I, III and protein kinase-C θ in skeletal muscle fibres of normal and streptozotocin-induced diabetic rats with and without *Ginkgo biloba* extract treatment.** The Histochemical Journal. 33: 213–219, 2001.

- Riede UN, Forstermann U, Drexler H, Freudenberg-Plessow B. **Inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure.** J Am Coll Cardiol. Vol 32, N°4:964-969. 1998.

- Roels B. **Paradoxical effects of endurance training and chronic hypoxia on myofibrillar ATPase activity.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294:1911-1918. 2008.

- Roy RR, Pierotti DJ, Flores V, Rudolph W, Edgerton VR. **Fibre size and type adaptations to spinal isolation and cyclical passive stretch in cat hindlimb.** J Anat, 180: 491-499. 1992.

- Rudnick J *et al.* **Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest.** The FASEB Journal express article 10.1096/fj.03-0792fje. Published online June 4, 2004.

- Russell B, Motlagh D, Ashley WW. **Form follows function: how muscle shape is regulated by work.** J Appl Physiol, 88: 1127-1132. 2000.

- Sardo P, Ferraro G. **Modulatory effects of nitric oxide-active drugs on the anticonvulsant activity of lamotrigine in an experimental model of partial complex epilepsy in the rat.** BMC Neuroscience, 8:47. 2007.

- Schluter JM, Fitts RH. **Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training.** The American Physiological Society. 1994.

- Schulz R, Kelm M, Heusch G. **Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury.** Cardiovascular Research 61:402– 413.2004.

- Silva DAS, Melo LA, Oliveira ACC. **Efeito do treinamento físico na massa corporal de ratos.** Motriz Rio Claro, v. 13 n.1 p.43-50. 2007.

- Silva LA *et al.* **Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle.** Eur J Appl Physiol. 105:861-867, 2009.

- Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, McKee NH, Plyley MJ.**Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle.** J Appl Physiol. 90:1407-1414. 2001.

- Smith LW, Smith JD, Criswell DS. **Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload.** J Appl Physiol 92:2005-2011, 2002.

- Song W, Kwak H, Kim J, Lawler JM. **Exercise Training Modulates the Nitric Oxide Synthase Profile in Skeletal Muscle From Old Rats.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. Vol. 64A, No. 5, 540–549. 2009.

- Spencer MR, Gastin PB. **Energy system contribution during 200- to 1500-m running in highly trained athletes.** Med Sci Sports Exerc, 33 (1): 157-162, 2001.

- Sultan KR, Dittrich BT, Leisner E, Paul N, Pette D. **Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle.** Am J Physiol Cell Physiol 280: C239–C247, 2001.

- Tatsumi R *et al.***Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor.** Am J Physiol Cell Physiol 290: C1487–C1494, 2006.

- Thomason DB, Biggs RB, Booth FW. **Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighed soleus muscle.** Am J Physiol, 257: 300-305. 1989.

- Thomason DB, Booth FW. **Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting.** J Appl Physiol, 68 (1): 1-12. 1990.

- Thompson LV, Johnson SA, Shoeman JA. **Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats.** J Appl Physiol, 84: 1937-1942. 1998.

- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M. **Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle.** Am J Physiol Cell Physiol 275:260-266, 1998.

•Tsui JCS, Baker DM, Shaw SG, Dashwood MR. **Alterations in Nitric Oxide Synthase Isoforms in Acute Lower Limb Ischemia and Reperfusion.** Angiology Volume 58, Number 5, 2007.

•Walker WF, Homberger DG. **Anatomy and dissection of the rat.** Third edition. W. H. Freeman and company. New York. 1997.

•Wang LC, Kernell D. **Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat.** J Anat, 198: 295-308. 2001.

•Zhang JS, Kraus WE, Truskey GA. **Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells.** Am J Physiol Cell Physiol 287:292-299, 2004.