

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

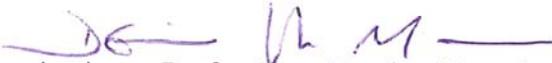
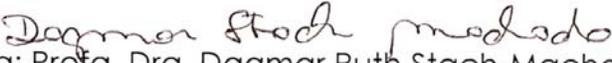


DANILO LOPES FERRUCCI

**EFEITO DO EXERCÍCIO INCREMENTAL EXAUSTIVO NAS METALOPROTEINASES 2 E 9 NO
MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS WISTAR.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniilo Lopes Ferrucci
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.


Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Co-orientadora: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F418e

Ferrucci, Danilo Lopes

Efeito do exercício incremental exaustivo nas metaloproteínas 2 e 9 no músculo gastrocnêmio de ratos Wistar / Danilo Lopes Ferrucci. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadoras: Denise Vaz de Macedo, Dagmar Ruth Stach-Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Metaloproteína. 2. Exercício exaustivo. 3. Músculo esquelético. 4. Adaptação (Biologia). 5. Ratos Wistar - Desempenho. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Stach-Machado, Dagmar Ruth, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of exhaustive incremental exercise in metalloproteinases 2 and 9 in the gastrocnemius muscle of rats.

Palavras-chave em inglês: Metalloproteinase; Exhaustive exercise; Skeletal muscle; Adaptation (Biology); Wistar rats – Performance.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Denise Vaz de Macedo, Maéli Dal Pai Silva, Marcelo Lancelotti.

Data da defesa: 24/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 24 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo (Orientadora)



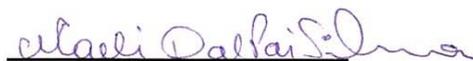
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Cesar Zoppi



Assinatura

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho



Assinatura

“Impossible is just a big word thrown around by small men who find it easier to live in the world they’ve been given than to explore the power they have to change it. Impossible is not a fact. It’s an opinion. Impossible is not a declaration. It’s a dare. Impossible is potential. Impossible is temporary.

Impossible is nothing.”

ADIDAS

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, pelo dom da vida.

À **FAMÍLIA**, sem a qual este momento não seria possível. Aos meus pais pela criação ímpar. **PAI**, meu velho, sabe que não foram muitas as oportunidades pra te dizer, mas nunca é tarde, admiro e amo você. **MÃE**, meu anjo, a pessoa mais incrível desse mundo, o eterno amor da minha vida, o exemplo de compreensão, bondade e carinho, amo você, obrigado por tudo. Ao **MEU IRMÃO**, exemplo de garra, força, coragem, inteligência e conduta. A **MINHA IRMÃ**, exemplo de serenidade, carinho, compaixão, garra, minha irmã caçula e minha protegida.

Aos **AMIGOS**, por estarem presentes na minha vida em diversos momentos de discussão, aprendizagem e troca de experiências profissionais e pessoais. Sem fazer menção em particular, até para não cometer injustiça, sou grato a TODOS pela contribuição ao longo da vida pessoal, profissional e acadêmica. Obrigado queridos amigos e amigas.

À **MINHA NAMORADA**, por dividir esse momento comigo, sendo paciente, compreensiva, carinhosa e extremamente generosa. Pela força nos momentos de dificuldade.

Aos **COMPONENTES DA BANCA** deste trabalho, pela disponibilidade e generosidade em contribuir para seu enriquecimento. Muito obrigado pela contribuição na minha evolução acadêmica e profissional.

À **PROFESSORA DENISE**, por ter me acolhido junto à família Labex, pela oportunidade, aprendizagem, compreensão, confiança e sabedoria compartilhada. Sou grato pelas oportunidades concedidas e pelas conquistas realizadas, contribuindo de forma inestimável na minha formação pessoal e profissional. Muito Obrigado.

À **PROFESSORA DAGMAR**, pela oportunidade ímpar, por me acolher junto à família do laboratório de Imunologia aplicada, por ter confiado no meu empenho e competência, pelas palavras de sabedoria, pelo carinho e generosidade em ceder a estrutura do seu laboratório para o desenvolvimento desse trabalho. Espero que essa cooperação permaneça por muitos e muitos anos. Muito Obrigado.

Ao **PROFESSOR MARCELO LANCELLOTTI**, por permitir a utilização dos equipamentos e da estrutura do Laboratório de Biotecnologia.

À **UNICAMP** e ao **LABEX**, pela infra-estrutura concedida para minha formação e conclusão deste trabalho.

Ao **CNPq**, por fomentar financeiramente este trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha **família**, aos **amigos do Labex** e **do Laboratório de Imunologia de Aplicada**, a minha namorada e a todos que de forma inestimável contribuíram para meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina difosfato
ATP	- Trifosfato de adenosina
C	- Grupo controle
Ca⁺²	- Íon Cálcio
cDNA	- DNA complementar
CO₂	- Dióxido de carbono
CT	- Cycle threshold
Cys	- Cisteína
D	- Distância total percorrida pelo animal no decorrer do teste
Di	- Distância de cada estágio
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
E	- Grupo de animais submetidos ao exercício
E₁	- Grupos de animais exercitados (pausa de 1h entre as sessões)
E₂	- Grupos de animais exercitados (pausa de 3h entre as sessões)
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GB	- Porção branca do músculo gastrocnêmio
GV	- Porção vermelha do músculo gastrocnêmio
HGF	- Fator de crescimento hepático
IGF	- Insulin-like Growth Factor I
m	- Massa corporal
MHC	- Myosin heavy chain
MMP-14	- Metaloproteinase 14 (Metaloproteinase de Membrana)
MMP-2	- Metaloproteinase 2

MMP-2 Ativa	- Isoforma ativa da metaloproteinase 2
MMP-9	- Metaloproteinase 9
MMP-9 Ativa	- Isoforma ativa da metaloproteinase 9
MMPs	- Metaloproteinases de matriz-extracelular
MTA	- Micro-Trauma Adaptativo
NaCl	- Cloreto de sódio
NO	- Óxido Nítrico
P	- Performance
Pi	- Fosfato inorgânico
Pró MMP	- Isoforma latente das metaloproteinases
Pró MMP-2	- Isoforma latente da metaloproteinase 2
Pró MMP-9	- Isoforma latente da metaloproteinase 9
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNA_m	- RNA mensageiro
RT-PCR	- Reação em cadeia da Polimerase em tempo real
SNC	- Sistema nervoso central
T_i	- Tempo de cada estágio;
TIMPs	- Inibidores teciduais de metaloproteinases
V_i	- Velocidade em cada estágio
W	- Trabalho mecânico total realizado pelo rato
Zn	- Zinco

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organização hierárquica do músculo esquelético, representado pelo músculo deltóide. Detalhe para a junção músculo-tendão e as subdivisões do tecido muscular (A); miofibrila (B); sarcômero (C) e miofilamentos, grosso e fino (D). Retirado de (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2008)..... **4**
- Figura 2.** Organização da matriz extracelular do músculo esquelético semitendinoso (bovino) após remoção das proteínas das fibras musculares, obtido por microscopia eletrônica de varredura. Epimísio (A), Perimísio (B) e Endomísio (C). Adaptado de (KJAER, 2004) **9**
- Figura 3.** Mecanismos regulatórios das MMPs podem incluir: (1) ativação ou repressão da expressão gênica através de sinais indutores ou repressores a partir do meio extracelular, seguido do processamento ou degradação do RNA mensageiro (RNA_m); (2) tradução protéica; (3) secreção constitutiva ou regulada; (4) localização extracelular ou na superfície da célula; (5) ativação proteolítica (zimógeno); (6) inibidores endógenos: TIMPs e α2-macroglobulina (inibição protéica) e (7) processamento ou inativação proteolítica. Adaptado de (PAGE-MCCAW, EWALD *et al.*, 2007). **16**
- Figura 4.** Desempenho dos animais dos grupos E₁ e E₂ submetidos a 3 sessões diárias de exercícios até a exaustão ao longo dos 6 dias.*Significativamente diferente do grupo C e dos dias 1ºd, 2ºd e 3ºd (p<0,05). #Significativamente diferente do grupo C e dos dias 1ºd, 2ºd, 3ºd e 4ºd (p<0,05). † Diferença significativa entre o 2ºd do grupo E₁ vs E₂(p<0,05) **30**
- Figura 5.** Análise da expressão gênica da metaloproteinase MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C

($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$).

..... **31**

Figura 6. Análise da expressão gênica do TIMP 2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$).

#Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$) **32**

Figura 7. Análise da expressão gênica da metaloproteinase MMP-9 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$).

..... **33**

Figura 8. Análise da expressão gênica do TIMP 1 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$).

#Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$) **34**

Figura 9. Concentração da metaloproteinase MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$),

#Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$) **35**

Figura 10. Gel de zimografia, detalhe para a atividade da MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio e tendão (C) para os grupos E₁ e E₂ **37**

Figura 11. Atividade da MMP-2, forma latente nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio para os grupos E₁ e E₂ e da forma intermediária no GV (C) e GB (D).

*Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$). **38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste de <i>performance</i>	24
Tabela 2 - Ensaios TaqMan ®.....	26

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação [1] - $W = \sum W = m D$ 24

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** - Teste de eficiência. Curva padrão e curva de amplificação, respectivamente do controle endógeno GAPDH (A e B) e do gene alvo TIMP 2 (C e D) para uma amostra de referência. **59**
- Anexo 2** - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (Faculdade de odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas)..... **59**

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Tipos de Fibras Musculares.....	5
1.2. Plasticidade muscular e o Exercício físico	6
1.3. A matriz extracelular no músculo esquelético.....	8
1.4. Reparo Muscular	11
1.5. Mecanotransdução	12
1.6. Metaloproteinases de matriz-extracelular (MMPs) e Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)	13
1.7. A influência das MMPs e dos TIMPs na plasticidade do músculo esquelético durante a atividade física.....	18
2. MATERIAL E MÉTODO	22
2.1. Animais.....	22
2.2. Período de adaptação	22
2.3. Grupos Experimentais.....	22
2.4. Protocolo de exercício.....	23
2.5. Quantificação do desempenho.....	24
2.6. Obtenção das amostras.....	25
2.7. Extração de RNA total e síntese de cDNA	25
2.8. RT-PCR em tempo real	26
2.9. Zimografia –.....	28

2.10. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> -	29
2.11. Análise Estatística -	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Desempenho dos animais ao longo dos 6 dias de exercícios	30
3.2. Alterações na expressão gênica das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e dos inibidores TIMP-1 e TIMP-2 ao longo das sessões de treino.	31
3.3 Alterações na concentração protéica da MMP-2 ao longo dos seis dias de exercícios..	35
3.4. Atividade da MMP-2 ao longo dos seis dias de exercícios.....	36
4. DISCUSSÃO	40
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS	49
7. ANEXOS	59

RESUMO

Os músculos esqueléticos são constituídos por fibras musculares e pela matriz extracelular. Em resposta ao exercício, o músculo apresenta a habilidade de transformar o estresse mecânico da contração muscular em adaptações de cunho biológico, a esse processo deu-se o nome de mecanotransdução. Embora pouco se saiba sobre a importância da matriz extracelular como mecanoreceptor, trabalhos anteriores mostram que o exercício pode causar alterações na expressão e atividade das metaloproteinases, que podem resultar em modificações na matriz extracelular. Nesse contexto, as MMPs são vistas como pivôs centrais e, através da degradação da matriz extracelular podem gerar fragmentos protéicos com funções distintas das proteínas integras, liberando ainda citocinas e fatores de crescimento associados à matriz, que em interação com receptores celulares fornecem informações à célula sobre o microambiente extracelular, regulando o comportamento e adaptação do tecido. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de três sessões diárias de exercício exaustivo, realizados com diferentes pausas recuperativas entre as sessões, grupo E₁ (1h) e grupo E₂ (3h), durante 6 dias consecutivos, na expressão das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2; e nas concentrações e atividade biológica das MMPs nas porções vermelha (GV) e branca (GB) do músculo Gastrocnêmio de ratos Wistar. Os animais foram sacrificados após 1º, 3º e 6º dias de exercício e os fragmentos coletados do músculo gastrocnêmio foram analisados via ELISA, zimografia e qRT-PCR. Como controle (C) do protocolo experimental utilizou-se ratos sedentários. Os animais exercitados (E) mostraram aumento de desempenho a partir do 4º dia. Não houve diferença significativa na performance dos grupos E₁ e E₂. Os genes analisados mostraram-se igualmente expressos em resposta ao exercício em ambas as porções do músculo gastrocnêmio, contudo, o grupo E₁ apresentou alterações mais acentuadas do que E₂ para todos os biomarcadores analisados. O grupo E₁ mostrou aumento na expressão das MMPs 2 e 9 no 3º dia de exercício, em ambas as regiões do músculo gastrocnêmio. Com relação aos TIMPs 1 e 2, os dados obtidos demonstram o aumento na expressão no GV e GB em resposta ao exercício (E₁ e E₂), em todos os tempos experimentais analisados. Todavia esse aumento foi mais acentuado para o grupo E₁. A concentração total de MMP-2 nos grupos E₁ e E₂ mostrou-se diminuída em todos os períodos analisados, para GV e GB. A atividade das isoformas latente e intermediária da MMP-2 apresentou-se diminuída em ambos os grupos exercitados no GB e apenas no grupo E₁ para o GV. A atividade e concentração da MMP-9 não foram detectadas neste estudo. O protocolo agudo utilizado nesse estudo induziu um aumento significativo no desempenho dos animais, independente do tempo de pausa entre as sessões. O efeito adaptativo observado nas MMPs 2 e 9 em GV e GB foi de diminuição quantitativa e qualitativa. Possivelmente o aumento significativo na expressão gênica tanto das MMPs quanto TIMPs no grupo E₁, permitiu um remodelamento acelerado na matriz extracelular do tecido, que possibilitou a melhora significativa no desempenho a partir do 3º dia. Considerando que ambos os tempo de pausa foram igualmente eficientes para aumentar a *performance*, seria melhor utilizar uma pausa de 3h entre as sessões, pois o processo de sinalização de síntese protéica demanda grande quantidade de energia, e depende da oferta de nutrientes em quantidade e qualidade adequada para a resposta

Palavras-chave: Metaloproteinase; Exercício Incremental exaustivo; Períodos recuperativos; Adaptação e *Performance*.

ABSTRACT

Skeletal muscles are composed by muscle fibers and extracellular matrix. In response to exercise, muscles have the ability to transform mechanical stress from their contraction in biological adaptations, and, this process was called mechanotransduction. Although little is known about the importance of the extracellular matrix acting as mechanoreceptors in this process, previous studies have shown that exercise can cause changes in the MMPs genetic expression and activity on the extracellular matrix. In this context, MMPs play the central role, once that the extracellular matrix degradation can generate fragments that are bioactive compounds and can interact with cell receptors to provide information regarding to extracellular microenvironment to the cells. Therefore, MMPs can regulate the behavior and adaptation of the muscle. The aims of this study were to evaluate the effect of three daily sessions of exhaustive exercise (performed with different recuperative breaks between sessions for six consecutive days) on the MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMPs) gene expression, as well as, MMP's concentration and biological activities on the rat gastrocnemius muscle red (RG) and white (WG) portions. The animals were sacrificed on exercise-days 1, 3 and 6 and muscle fragments were collected and stored for later analysis through zymography, ELISA and qRT-PCR. Sedentary rats were used as controls. The exercised animals (E) showed an increased performance from the 4th day ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the performance of E₁ and E₂ groups. The genes examined were similarly expressed in response to exercise on the analyzed muscle regions, however, the group E₁ have more pronounced changes than E₂ when these biomarkers was analyzed. The E₁ showed an increased expression of MMP-2 and -9 on the 3rd day of exercise comparing to the control group for RG e WG. Regarding TIMPs 1 and 2, our data showed an increase on their expression in RG and WG responsive to exercise (E₁ and E₂) during all time experimental points, but this increase was more pronounced in group E₁. Furthermore, total concentration of MMP-2 in both groups was significantly reduced when compared to sedentary animals for all time points and muscle regions. The activity of latent and intermediate MMP-2 isoforms were significantly reduced in both exercised groups in the WG and, only, in the E₁ to the RG. MMP-9 concentration and activities were not detected in this study. The acute protocol designed for this study induced an increase in the animal performances, regardless of the pauses employed between sessions. The adaptive effect observed in MMP-2 and 9 in the RG and WG was reduced quantitatively and qualitatively, due to the increased expression of both MMPs and TIMPs in group E₁ leading to an accelerated remodeling the gastrocnemius extracellular matrix, allowing a significant improvement on performance since the third day onwards. Considering that both rest periods were equally effective to improve physical performance, rest periods of 3 hours between sessions are more adequate due to processes of protein synthesis, once that demands a great amount of energy and depends on the supply of nutrients in quantity and quality suitable for the positive response.

Keywords: Metalloproteinase; Exhaustive incremental exercise, Rest periods; Adaptation and Performance

1. INTRODUÇÃO

O tecido muscular esquelético desempenha inúmeras funções vitais na locomoção, sustentação e no metabolismo energético. Formado por uma variedade de músculos com propriedades, funções, formas e tamanhos distintos, corresponde a 40-55% da massa corporal na maioria dos mamíferos (CARMELI, MOAS, REZNICK e COLEMAN, 2004; ZIERATH e HAWLEY, 2004; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006; OHTAKE, TOJO e SEIKI, 2006).

Os músculos são constituídos por dois principais componentes, as fibras musculares inervadas, responsáveis pela contração muscular (encurtamento muscular); e o tecido conjuntivo, caracterizado como uma malha ou rede de proteínas com a função de transformar a contração muscular em movimento (KJAER, 2004; FILIPPIN, MOREIRA, MARRONI e XAVIER, 2009).

As fibras musculares são caracterizadas pela contratilidade e excitabilidade, ou seja, pela capacidade de contrair em resposta aos impulsos nervosos advindos do sistema nervoso central (SNC).

A organização do tecido muscular é complexa e hierárquica, conforme mostrada na Figura 1. Podemos observar que os músculos são formados por um conjunto de fascículos, que são constituídos por células ou fibras agrupadas. As fibras, por sua vez, são formadas por conjuntos de miofibrilas, compostas por inúmeros sarcômeros em paralelo. Os sarcômeros são formados por miofilamentos (BROOKS, 2003).

O sarcômero representa a microestrutura básica das células musculares. É composto por uma infinidade de proteínas altamente organizadas que participam de forma ativa ou passiva na geração da força muscular. Dentre estas proteínas destacam-se os filamentos de

miosina e actina, que constituem o filamento grosso e filamento fino, respectivamente. Fazem parte ainda do filamento fino as proteínas troponina e tropomiosina.

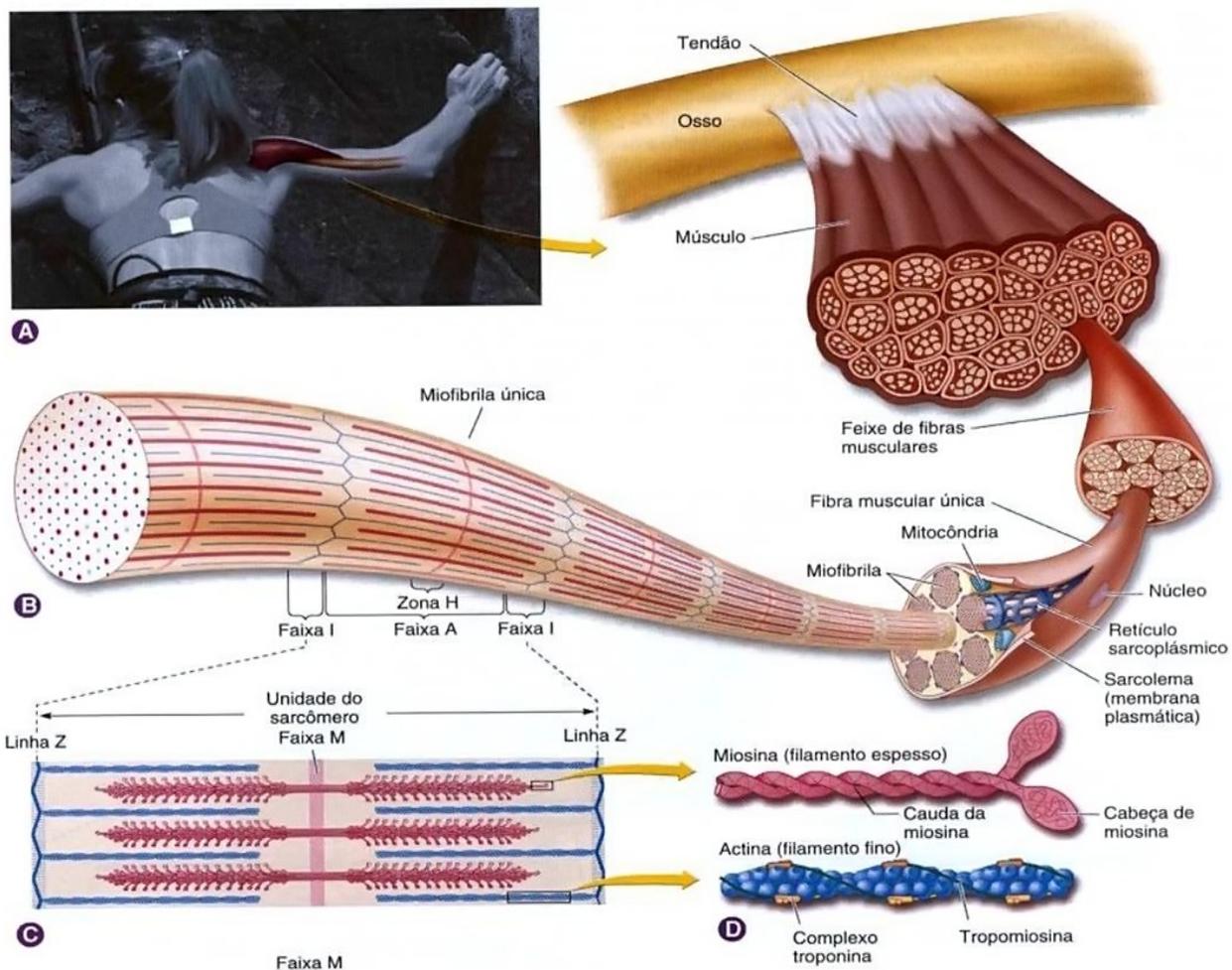


Figura 1. Organização hierárquica do músculo esquelético, representado pelo músculo deltóide. Detalhe para a junção músculo-tendão e as subdivisões do tecido muscular (A); miofibrila (B); sarcômero (C) e miofilamentos, grosso e fino (D). Retirado de (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2008)

A ligação do íon cálcio (Ca^{++}) no seu sítio de ligação na troponina produz uma alteração conformacional nessa proteína, que resulta no deslocamento da tropomiosina ao longo da actina. Esse deslocamento libera o sítio de ligação da actina, favorecendo sua

interação com a miosina. A miosina possui atividade ATPásica, sendo que a saída seqüencial de fosfato (Pi) e adenosina difosfato (ADP) da molécula promove a geração de tensão e o conseqüente encurtamento do sarcômero através da aproximação das linhas Z (BROOKS, 2003; MCARDLE, 2007).

1.1. Tipos de Fibras Musculares

Em meados de 1873, o anatomista Antoine Ranvier analisou músculos de coelhos de acordo com as colorações observadas como consequência do conteúdo de mioglobina presente no tecido, e classificou os músculos em “vermelho” e “branco” (RANVIER, 1873). Posteriormente, Engel (1962), baseado em resultados obtidos através de técnicas histoquímicas propôs a divisão do músculo esquelético em fibras vermelhas ou de contração lenta, e brancas ou de contração rápida (ENGEL, 1962).

Mais recentemente, através da análise da expressão de diferentes isoformas de miosina de cadeia pesada (do inglês, *myosin heavy chain* ou MHC) da fibra muscular por eletroforese; conjugada com técnicas imunohistoquímicas para detecção da atividade da enzima m-ATPase foi proposto que as fibras musculares podiam ser divididas em puras e polimórficas ou híbridas (PETTE e STARON, 2000).

As fibras puras expressam apenas um gene para a MHC e são classificadas em tipo **I**, para o MHC I, tipo **IIA**, para o MHC IIa, tipo **IID/IIx** para expressão do MHC II d e fibras do tipo **IIB** com MHC do tipo IIb, sendo que, as fibras do tipo **I** e **IIA** apresentam metabolismo predominantemente oxidativo, e as fibras do tipo **IID/IIx** e **IIB** glicogenolítico (PETTE e STARON, 2000). As fibras do tipo do IIB, isoforma que propicia maior velocidade de contração, são expressas apenas em pequenos mamíferos, não sendo observadas em

humanos, enquanto a fibra IID em humanos é equivalente a fibra que expressa MHC do tipo IIX (fibra IIX) em ratos, camundongos e coelhos (PETTE e STARON, 2000; ZIERATH e HAWLEY, 2004).

Já as fibras polimórficas co-expressam mais de uma isoforma para MHC, e são classificadas de acordo com a isoforma de MHC dominante: **IC**=MHCI > MHCIIa; **IIC**=MHCIIa > MHCI; **IAD**=MHCIIa > MHCIIId; **IbD**=MHCIIb > MHCIIId (PETTE e STARON, 2000). A combinação na expressão das diferentes isoformas de MHC é importante, pois permite o desenvolvimento de fibras com diferentes propriedades bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e metabólicas, possibilitando padrões distintos de contrações musculares (DUBOWITZ e PEARSE, 1960; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006).

As características de contração de um músculo (velocidade de contração, produção de força, resistência a fadiga, utilização de substratos) são determinadas pela soma das forças desenvolvidas em cada fibra que o compõem. Esse papel é atribuído a matriz extracelular, o elemento passivo do tecido muscular esquelético, (PETTE e STARON, 2000; KJAER, 2004).

1.2. Plasticidade muscular e o Exercício físico

Um estudo pioneiro usando modelo animal de desnervação/reinervação realizado em meados de 1960 constatou que quando músculos com características de contração lenta eram desnervados e em seguida reinervados com fibras nervosas de músculos com características de contração rápida, apresentavam aumento na velocidade de contração muscular (BULLER, ECCLES e ECCLES, 1960b; a; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006). A essa

habilidade, Jonh Eccles deu o nome de “Plasticidade Muscular” (PETTE, 2001; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006).

Hoje em dia o termo plasticidade muscular é utilizado para referir à capacidade única e notável que o músculo esquelético apresenta de se adaptar a diferentes demandas biomecânicas impostas, alterando suas propriedades com relação à morfologia, e características bioquímicas e fisiológicas (ALLBROOK, 1981). Estudos têm demonstrado que vários estímulos são capazes de causar alterações na plasticidade do tecido muscular (PETTE, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006; STEWART e RITTWEGER, 2006), dentre os quais podemos citar eventos patológicos como a obesidade (ZIERATH e HAWLEY, 2004) e a Distrofia Muscular de Duchenne, e os fisiológicos, com destaque para a atividade física.

O músculo esquelético adulto é um tecido estável na ausência de atividade física sistematizada, com apenas uma pequena ativação no *turnover* de núcleos. Contudo, mostra-se altamente responsivo quando submetido a modulações na intensidade e duração do exercício ou programa de treinamento, desencadeando um rápido e extensivo processo de reparo e remodelamento tissular frente à injúria do tecido, com sinalização de síntese protéica específica e transformações fenotípicas (CHARGE e RUDNICKI, 2004; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006; HORNBERGER, CHU, MAK, HSIUNG, HUANG e CHIEN, 2006).

As alterações fenotípicas ocasionadas nas fibras musculares podem ser caracterizadas por mudanças no número, tamanho e forma das fibras (CHARGE e RUDNICKI, 2004; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006; STEWART e RITTWEGER, 2006) e expressão diferenciada das isoformas de miosina, com transições entre os diferentes tipos de fibra

muscular (PETTE, 2001). O músculo esquelético adapta-se ainda através de mudanças qualitativas e quantitativas nas enzimas envolvidas com a capacidade metabólica das vias aeróbias e anaeróbias de ressíntese de ATP e o armazenamento das reservas energéticas (PETTE, 2001).

As respostas são específicas, mas acontecem após treinamento tanto de Endurance quanto de força, de exercícios com caráter exaustivo ou com grande componente de contração excêntrica (KOSKINEN, WANG, AHTIKOSKI, KJAER, HAN, KOMULAINEN, KOVANEN e TAKALA, 2001).

1.3. A matriz extracelular no músculo esquelético

A matriz extracelular no músculo esquelético é composta essencialmente por colágeno, contendo também elastina, proteoglicanos e glicoproteínas (TAKALA e VIRTANEN, 2000; CARMELI, MOAS *et al.*, 2004; KJAER, 2004). Da mesma forma que o tecido muscular, a matriz extracelular também possui organização complexa. Forma estruturas denominadas bainhas, dentre as quais destacamos o epimísio, estrutura formada pelo tecido conjuntivo que circunda o músculo todo, o perimísio, que divide o músculo em fascículos e o endomísio que circunda individualmente cada fibra **[Figura 2]** (TAKALA e VIRTANEN, 2000; CARMELI, MOAS *et al.*, 2004; KJAER, 2004; FILIPPIN, MOREIRA *et al.*, 2009).

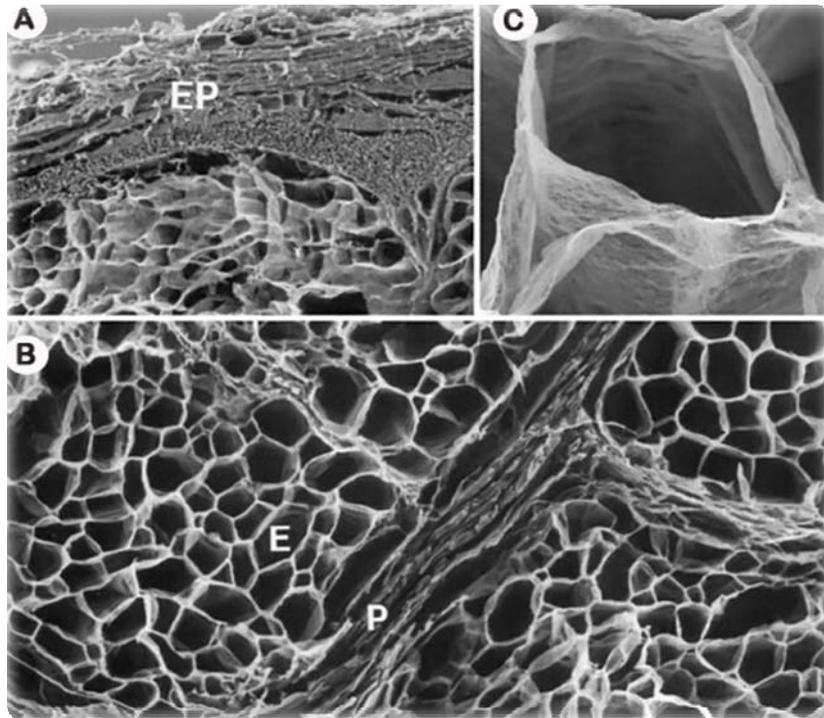


Figura 2. Organização da matriz extracelular do músculo esquelético semitendinoso (bovino) após remoção das proteínas das fibras musculares, obtido por microscopia eletrônica de varredura. Epimísio (A), Perimísio (B) e Endomísio (C). Adaptado de (KJAER, 2004)

Além do endomísio, cada fibra muscular é envolta pela “lâmina ou membrana basal”, que contém colágeno do tipo IV, laminina, proteoglicanos, heparan sulfato, e as fibras colagênicas associadas (CARMELI, MOAS *et al.*, 2004).

O colágeno perfaz de 20 a 25% das proteínas totais do corpo, e é usualmente subdividido em colágenos fibrilares (Tipo I, II, III, V e XI) e não fibrilares (tipo IV, VII, IX e XII) (TAKALA e VIRTANEN, 2000), entre outros tipos de colágenos. O colágeno fibrilar do tipo I, III e em alguma extensão do tipo V encontra-se principalmente no endomísio, no perimísio e epimísio. Já o colágeno do tipo IV é encontrado principalmente na lâmina basal (CARMELI,

MOAS *et al.*, 2004; KJAER, 2004; CARMELI, MOAS, LENNON e POWERS, 2005). É importante salientar que a composição protéica da matriz e a localização dos diferentes tipos de colágenos apresentam estreita relação com a função do tecido muscular e tecido conjuntivo (GROUNDS, MCGEACHIE, DAVIES, SOROKIN e MALEY, 1998; GROUNDS, WHITE, ROSENTHAL e BOGOYEVITCH, 2002).

A matriz extracelular tem como principais funções a transmissão da força gerada pelas fibras musculares durante a contração muscular ao esqueleto, via tendão e junção miotendinosa. Promove o movimento articular, a transmissão de força lateral entre as fibras e entre fascículos, e garante ainda a resposta elástica passiva do tecido no processo de contração muscular (TIDBALL, 1991; MAAS, BAAN e HUIJING, 2001). Para isso a matriz apresenta uma rica variedade de proteínas insolúveis agregadas, que interagem entre si e com as células do tecido muscular, formando uma rede ou malha protéica com funções distintas, tais como suporte estrutural, proteção às fibras e estabilidade mecânica durante o processo de contração do músculo (FOIDART, FOIDART e ENGEL, 1981; AHTIKOSKI, RISO, KOSKINEN, RISTELI e TAKALA, 2004; MOTT e WERB, 2004; CARMELI, MOAS *et al.*, 2005).

Sabe-se hoje que mais do que um elemento elástico passivo no processo de contração, a matriz representa um reservatório de substâncias. A degradação da matriz possibilita a liberação dessas substâncias, cuja interação com receptores celulares fornecem informações sobre o microambiente exterior a célula, possibilitando uma reação global ao estímulo (MOTT e WERB, 2004).

1.4. Reparo Muscular

A atividade contrátil induz micro-traumas de graus variados no sistema muscular esquelético, tecido conjuntivo e articulações (SMITH, ANWAR, FRAGEN, RANANTO, JOHNSON e HOLBERT, 2000; WARREN, INGALLS, LOWE e ARMSTRONG, 2001; PROSKE e ALLEN, 2005; SMITH, KRUGER, SMITH e MYBURGH, 2008). Essas pequenas lesões teciduais são prontamente reparáveis, e por isso foram denominadas por Smith (SMITH, ANWAR *et al.*, 2000) de Micro-Traumas Adaptativos (MTA). Os MTAs caracterizam-se pela ruptura da matriz extracelular, lâmina basal e do sarcolema das fibras (GIBALA, INTERISANO, TARNOPOLSKY, ROY, MACDONALD, YARASHESKI e MACDOUGALL, 2000; FRIDEN e LIEBER, 2001; HAWKE, 2005), resultando em uma resposta inflamatória aguda, branda e local, que têm como função viabilizar e sinalizar a regeneração e desenvolvimento do tecido, provendo a resposta adaptativa positiva ao organismo que se espera em resposta ao estímulo aplicado (SMITH, ANWAR *et al.*, 2000). Como os MTAs representam danos temporários e reparáveis, integram o processo de regeneração e remodelamento tissular (SMITH, ANWAR *et al.*, 2000).

O reparo do tecido muscular é um processo altamente sincronizado, que envolve a ativação de várias respostas moleculares e celulares, podendo ser dividido em três fases: degenerativa (necrose do tecido), regenerativa (miogênese) e de remodelamento tissular (VIERCK, O'REILLY, HOSSNER, ANTONIO, BYRNE, BUCCI e DODSON, 2000; SMITH, KRUGER *et al.*, 2008; FILIPPIN, MOREIRA *et al.*, 2009). Envolve, portanto, respostas metabólicas específicas (hormonais, imunológicas, expressão de fatores de crescimento e citocinas) e adequadas para sinalização da síntese de novas proteínas e da re-estruturação da arquitetura matricial e do citoesqueleto celular. Toda essa resposta adaptativa leva ao incremento das

capacidades biomotoras envolvidas com o processo contrátil, aumentando o desempenho (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGE e RUDNICKI, 2004; HAWKE, 2005).

1.5. Mecanotransdução

Experimentos realizados com culturas de células musculares demonstraram que intervenções mecânicas induziam alterações nos mecanismos de síntese protéica independentemente da interação com outras células ou de fatores circulantes como a testosterona, IGF-1 e outros fatores de crescimento (HORNBERGER, STUPPARD, CONLEY, FEDELE, FIOROTTO, CHIN e ESSER, 2004; TIDBALL, 2005a; HORNBERGER e CHIEN, 2006). Essas observações sugeriram que o tecido muscular possui uma capacidade intrínseca de converter as informações mecânicas em eventos bioquímicos, que regulam o processo de síntese protéica (HORNBERGER, STUPPARD *et al.*, 2004; HORNBERGER, CHU *et al.*, 2006; HORNBERGER, SUKHIJA e CHIEN, 2006). A essa habilidade de transformar o estresse mecânico da contração muscular em adaptações de cunho biológico deu-se o nome de mecanotransdução (HORNBERGER, STUPPARD *et al.*, 2004; TIDBALL, 2005b; HORNBERGER, CHU *et al.*, 2006; HORNBERGER, SUKHIJA *et al.*, 2006).

Os avanços na engenharia genética também têm facilitado o estudo das vias de sinalização, responsáveis pelo remodelamento das proteínas do citoesqueleto (fibras e matriz extracelular) e pelas alterações de fenótipo no tecido muscular. (PETTE, 2001; BASSEL-DUBY e OLSON, 2006). Esses estudos sugerem haver mecanismos de comunicação entre as células que poderiam disparar cascatas de sinalização específicas, e determinar a função e a forma muscular (HORNBERGER, STUPPARD *et al.*, 2004; TIDBALL, 2005b; HORNBERGER, CHU *et al.*, 2006; HORNBERGER, SUKHIJA *et al.*, 2006).

Para que a mecanotransdução ocorra deve haver a interação entre os sinais extracelulares e os receptores de superfície da célula, chamados nesse caso de mecanoreceptores (HORNBERGER, STUPPARD *et al.*, 2004; HORNBERGER e CHIEN, 2006). Essa interação ativaria cascatas de sinalização intracelulares, promovendo a ativação de fatores que contribuem para a reprogramação gênica. Como conseqüências, ocorreriam mudanças na massa muscular (hipertrofia) e alterações nas propriedades contráteis e metabólicas das fibras musculares.

Diversos candidatos são apontados como possíveis mecanoreceptores, sendo os dois principais a matriz extracelular e os lipídeos de membrana (HORNBERGER, STUPPARD *et al.*, 2004; HORNBERGER e CHIEN, 2006). No entanto, pouco ainda se sabe sobre a importância da matriz extracelular como mecanoreceptor. Nesse contexto, as metaloproteinases da matriz (MMPs) são vistas como pivôs centrais, uma vez que através da degradação da matriz podem gerar fragmentos protéicos com funções distintas das proteínas íntegras, liberando ainda citocinas e fatores de crescimento associados a essa malha protéica, que em interação com receptores celulares fornecem informações à célula sobre o microambiente extracelular, regulando o comportamento do tecido muscular de maneiras distintas (CHAKRABORTI, MANDAL, DAS, MANDAL e CHAKRABORTI, 2003).

1.6. Metaloproteinases de matriz-extracelular (MMPs) e Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) foram identificadas em diversas espécies (STERNLICHT e WERB, 2001), desde organismos como as hidras até os seres humanos (LEONTOVICH, ZHANG, SHIMOKAWA, NAGASE e SARRAS, 2000; VISSE e NAGASE, 2003; PAGE-

MCCAWE, EWALD e WERB, 2007). Constituem uma família de 25 proteínas, das quais 24 são encontradas em mamíferos (PARKS, WILSON e LÓPEZ-BOADO, 2004).

As MMPs são proteínas caracterizadas por ativação dependente de íons metálicos, normalmente zinco (Zn) ou Ca, e apresentam estrutura modular conservada, constituída na maioria dessas proteínas por um domínio catalítico e um pró-domínio (CHAKRABORTI, MANDAL *et al.*, 2003; PAGE-MCCAWE, EWALD *et al.*, 2007). O pró-domínio contém um resíduo de cisteína (Cys) conservado que interage com o átomo de Zn presente no domínio catalítico, mais especificamente no sítio ativo. A interação do resíduo de Cys com o Zn mantém a enzima na forma inativa ou latente (Pró-MMP) (MATRISIAN, 2000; VISSE e NAGASE, 2003; PARKS, WILSON *et al.*, 2004; PAGE-MCCAWE, EWALD *et al.*, 2007), impedindo a ligação e clivagem de substratos. Dessa forma, a ativação das MMPs é coordenada por um mecanismo denominado "Cysteine Switch", onde a interação conservada (ON) entre o resíduo de Cys e o Zn determina a inatividade da enzima (OFF). Já a dissociação entre o resíduo de Cys e o átomo de Zn (OFF), leva a ativação das MMPs (ON) (VAN WART e BIRKEDAL-HANSEN, 1990).

Embora diversos estudos apontem como principal função das MMPs sua habilidade de degradar proteínas estruturais da matriz extracelular (colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos), essas proteases também parecem envolvidas em uma variedade de processos. São capazes de clivar moléculas dispostas na superfície das células, podendo regular o comportamento celular; podem influenciar uma série de atividades biológicas que incluem aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese de tecidos, migração celular, remodelamento e crescimento de diferentes tecidos (NELSON, FINGLETON, ROTHENBERG e MATRISIAN, 2000; STERNLICHT e WERB, 2001; MOTT e WERB, 2004).

Vale ressaltar ainda seu papel na cicatrização de feridas e no processo de angiogênese. Devido às funções diversas, as MMPs têm sido consideradas fatores regulatórios importantes na homeostasia da matriz extracelular (TAKALA e VIRTANEN, 2000; STERNLICHT e WERB, 2001; PARKS, WILSON *et al.*, 2004; PAGE-MCCAW, EWALD *et al.*, 2007).

As MMPs são divididas em cinco categorias principais, de acordo com a estrutura de seu domínio modular e sua conseqüente forma de atuação sobre substratos específicos:

- **Colagenases ou calagenase intersticial:** MMPs 1, 8, 13 e 18, são ativadas contra o colágeno fibrilar;
- **Gelatinases, também conhecidas por colagenases tipo IV:** A ou MMP-2 e B ou MMP-9, têm grande atividade na denaturação de colágeno;
- **Estromelisininas:** MMPs 3, 10 e 11, degradam componentes da matriz extracelular que não são compostos por colágeno;
- **MMPs de membrana (MT-MMP):** MMPs 14, 15, 16, 17, 24 e 25, possuem um domínio transmembrana e dentre suas funções está a de ativação de outras MMPs;
- **MMPs que não se enquadram nos grupos anteriores:** MMPs 7, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27 e 28.

Devido à grande sobreposição das especificidades de MMPs por diferentes substratos, costuma-se assumir que a função biológica de cada uma delas é ditada por padrões de expressão diferencial. De fato, as diferenças na expressão temporal, espacial e induzível de uma MMP tem sido frequentemente associadas com a diferenciação de funções entre elas (STERNLICHT e WERB, 2001).

Como as MMPs são secretadas normalmente na forma de zimogênios ou inativas (latente), precisam ou ser clivadas por proteases, como serina proteinases ou outras MMPs, ou passarem por autoprocessamento para adquirir uma conformação ativa (STERNLICHT e WERB, 2001; PARKS, WILSON *et al.*, 2004). Isso faz com que seu funcionamento seja rigorosamente regulado nos níveis transcricionais ou pós-transducionais, com a participação de ativadores e inibidores (PARKS, WILSON *et al.*, 2004; PAGE-MCCAW, EWALD *et al.*, 2007), conforme mostrado na Figura 3.

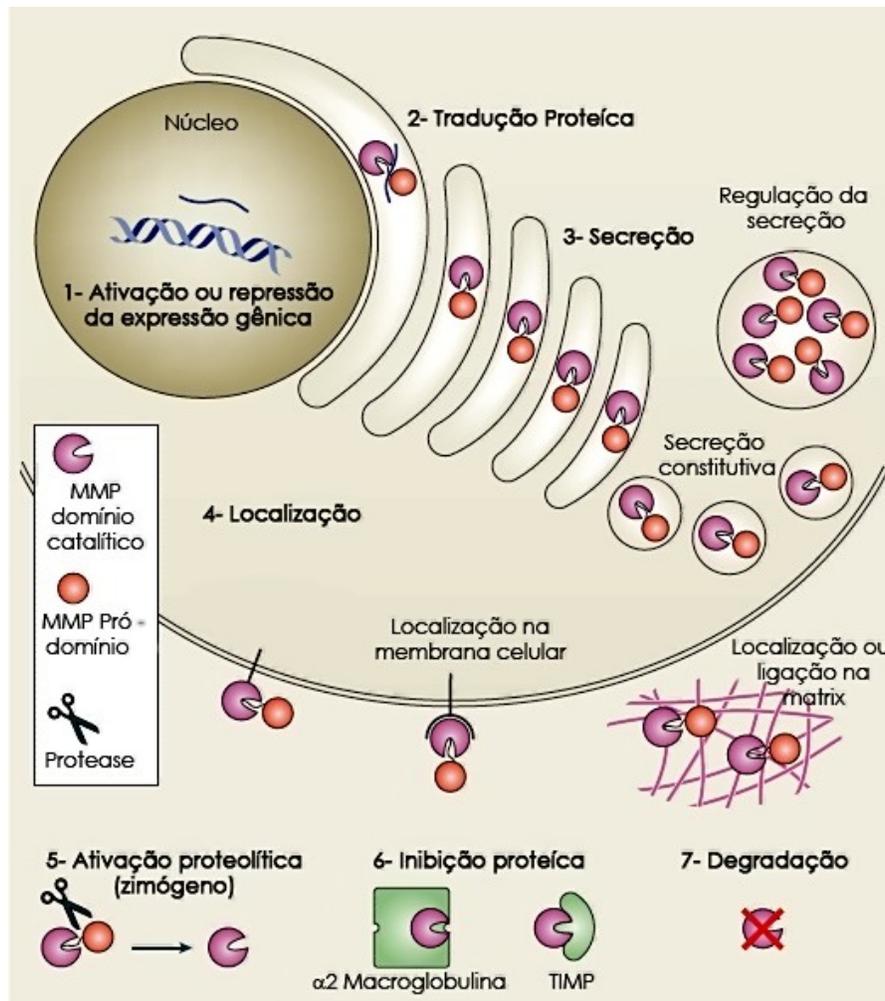


Figura 3. Mecanismos regulatórios das MMPs podem incluir: (1) ativação ou repressão da expressão gênica através de sinais indutores ou repressores a partir do meio extracelular,

seguido do processamento ou degradação do RNA mensageiro (RNA_m); **(2)** tradução protéica; **(3)** secreção constitutiva ou regulada; **(4)** localização extracelular ou na superfície da célula; **(5)** ativação proteolítica (zimógeno); **(6)** inibidores endógenos: TIMPs e α 2-macroglobulina (inibição protéica) e **(7)** processamento ou inativação proteolítica. Adaptado de (PAGE-MCCAW, EWALD *et al.*, 2007).

A expressão gênica das MMPs costuma ser regulada por numerosos fatores estimulantes como as citocinas e fatores de crescimento ou inibitórios, através da ação dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e proteínas como α 2-macroglobulina (PARKS, WILSON *et al.*, 2004; PAGE-MCCAW, EWALD *et al.*, 2007). Existem também indícios de regulação pós-transcricional através da estabilização ou processamento de moléculas de RNA_m (STERNLICHT e WERB, 2001). Além disso, a conversão da forma latente em forma ativa representa um passo importante na regulação das MMPs, e parece ser dependente das cargas mecânicas impostas à matriz e dos danos causados à estrutura do tecido muscular.

Em relação aos inibidores, deve-se destacar um grupo de quatro proteínas contendo doze resíduos de Cys em regiões conservadas, denominados de TIMPs, que são expressos por uma grande variedade de tipos celulares e estão presentes em muitos tecidos e fluídos corporais (LAMBERT, DASSE, HAYE e PETITFRERE, 2004).

Os TIMPs são capazes de formar complexos não-covalentes com as MMPs, ligando-se de forma reversível em regiões altamente conservadas das mesmas, principalmente nos sítios de ligação das enzimas ao seu metal correspondente (GOMEZ, ALONSO, YOSHIJI e THORGEIRSSON, 1997). Diferentes TIMPs se distinguem com relação à sua capacidade de se ligar às diferentes MMPs (WOESSNER e NAGASE, 2000).

1.7. A influência das MMPs e dos TIMPs na plasticidade do músculo esquelético durante a atividade física.

Embora, os estudos evidenciem que as MMPs têm participação fundamental em diversos processos e diferentes tecidos, ainda hoje pouco se sabe a respeito do papel das MMPs no tecido muscular esquelético com relação às adaptações sinalizadas pelo exercício físico (MASSOVA, KOTRA, FRIDMAN e MOBASHERY, 1998; CARMELI, MOAS *et al.*, 2004).

Os poucos estudos envolvendo as MMPs, o tecido muscular esquelético e os efeitos do exercício físico sugerem a participação das MMPs no reparo e regeneração de microtraumas e lesões provenientes da atividade contrátil, na proliferação e diferenciação miofibrilar, na homeostasia das fibras e do tecido conjuntivo (matriz extracelular) (CARMELI, MOAS *et al.*, 2004; CARMELI, MOAS *et al.*, 2005; OHTAKE, TOJO *et al.*, 2006).

As MMPs encontradas no tecido muscular são produzidas principalmente por fibroblastos (KJAER, 2004), mioblastos (HAEUSLER, WALTER, HELMREICH e EGERBACHER, 2005) e células endoteliais (KUME, SATOMURA, NISHISHO, KITAOKA, YAMANOUCHI, TOBIUME e NAGAYAMA, 2002) e incluem diferentes isoformas, como a MMP-2, 3, 7 e 9, sendo encontradas principalmente na matriz na forma solúvel, com exceção da metaloproteinase 14 (MMP-14) que encontra-se associada à membrana da célula (CARMELI, MOAS *et al.*, 2004; KJAER, 2004). Todavia, no músculo esquelético, duas delas recebem destaque, a metaloproteinase 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), conhecidas respectivamente como gelatinase A e B (VISSE e NAGASE, 2003; CARMELI, MOAS *et al.*, 2004; CARMELI, MOAS *et al.*, 2005).

A MMP-2 degrada a elastina, fibronectina, colágenos do tipo I, II, III e IV e outros componentes da matriz extracelular, sendo expressa e secretada constitutivamente (STRONGIN, COLLIER, BANNIKOV, MARMER, GRANT e GOLDBERG, 1995) em mioblastos e fibroblastos sob condições fisiológicas, tornando-se mais expressa diante dos fatores estimulantes (citocinas) em diversas condições como: patologias, inflamação e exercício exaustivo. Além de participar na manutenção da integridade da matriz no tecido muscular, a MMP-2 parece ser parte integrante do processo de ativação, proliferação e diferenciação miofibrilar no tecido em processo de regeneração e remodelamento (OHTAKE, TOJO *et al.*, 2006).

A MMP-9 é produzida por diversos granulócitos na medula óssea, sendo armazenada nos grânulos terciários de neutrófilos circulantes. É liberada através da ativação de neutrófilos por mediadores inflamatórios (HASTY, POURMOTABBED, GOLDBERG, THOMPSON, SPINELLA, STEVENS e MAINARDI, 1990; NATHAN, 2006). Em condições fisiológicas não é encontrada em grande quantidade no tecido muscular, sendo mais expressa em situações de exercício físico com danos as estruturas musculares ou condições que envolvam os mecanismos de isquemia-reperfusão, ou seja, que induzem degradação da lâmina basal (MATRISIAN, 1992; ROACH, FITRIDGE, LAWS, MILLARD, VARELIAS e COWLED, 2002). Tem como função fisiológica eliminar células danificadas ou em processo de necrose, preparando assim o músculo esquelético para fase para reparo e regeneração (KHERIF, LAFUMA, DEHAUPAS, LACHKAR, FOURNIER, VERDIERE-SAHUQUE, FARDEAU e ALAMEDDINE, 1999; ZIMOWSKA, BRZOSKA, SWIERCZYNSKA, STREMINSKA e MORACZEWSKI, 2008).

A MMP-2 mostra-se regulada mais tardiamente, sendo responsável pela fase de regeneração, onde exhibe importante papel na ativação de células satélites. As células

satélites musculares são células indiferenciadas, mononucleares e normalmente encontradas no estado quiescente no tecido muscular esquelético adulto. Quando são ativadas dividem-se e, após diversas sessões de proliferação, fundem-se para formar uma nova fibra, ou então auxiliam no reparo de uma fibra que esteja danificada, através da inserção de novos mionúcleos (KADI, CHARIFI, DENIS, LEXELL, ANDERSEN, SCHJERLING, OLSEN e KJAER, 2005).

Mudanças mecânicas no tecido muscular podem dar início a uma série de eventos que ativam as células satélites, embora os mecanismos ainda não totalmente delineados. Sugere-se que em resposta ao estresse mecânico ocorre um aumento na produção de algumas MMPs, como a MMP-2, em paralelo ao aumento da produção de óxido nítrico (NO). O NO promoveria a ativação das MMPs, as MMPs ativadas contribuiriam para a degradação da matriz extracelular e a conseqüente liberação de fatores de crescimento (HGF) associado à proteoglicanos da matriz. O HGF agora livre poderia ligar-se então ao receptor c-met das células satélites, tornando-as ativas e contribuindo para o processo de reparo (YAMADA, SANKODA, TATSUMI, MIZUNOYA, IKEUCHI, SUNAGAWA e ALLEN, 2008).

Os mecanismos adaptativos elicitados na matriz dependem do estado das macromoléculas que as compõem. A ação exacerbada das MMPs pode modificar a integridade das proteínas da matriz, afetando a liberação de fragmentos bioativos, fatores de crescimento e citocinas, prejudicando assim as adaptações advindas do exercício físico controlado (KJAER, 2004). Isso ressalta a importância da existência de inibidores teciduais.

O TIMP-1 liga-se preferencialmente às formas latentes e ativas da MMP-9 (WILHELM, COLLIER, MARMER, EISEN, GRANT e GOLDBERG, 1989), enquanto o TIMP-2 apresenta maior

afinidade às formas latentes e ativas da MMP-2 (WARD, HEMBRY, REYNOLDS e MURPHY, 1991). Os TIMPs ligam de forma não-covalente e reversível. Entretanto outros inibidores como a proteína de fase aguda α 2-macroglobulina ligam-se as MMPs de forma covalente e irreversível, contribuindo para o mecanismo de eliminação (*clearance*) dessas proteínas.

Os TIMPs também são mais expressos em resposta ao exercício (KOSKINEN, AHTIKOSKI, KOMULAINEN, HESSELINK, DROST e TAKALA, 2002). Foi proposto que mais que uma ação competitiva, a expressão de TIMPs ligeiramente posterior a expressão de MMPs permitiria o controle da degradação exacerbada do conteúdo de colágeno e outras moléculas de matriz, contribuindo para as adaptações positivas do tecido muscular esquelético.

A expressão de MMPs e dos TIMPs, assim como outros mecanismos fisiológicos podem ser influenciada pelas modulações de intensidade, volume do exercício, tempo de recuperação entre os estímulos e o estresse mecânico aos quais os músculos são submetidos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de três sessões diárias de exercício até a exaustão, realizados com diferentes pausas recuperativas entre as sessões, durante o período de 6 dias, na expressão das MMPs 2 e 9 e dos TIMPs 1 e 2; e nas concentrações e atividade biológica das MMPs na porção vermelha (GV) e branca (GB) do músculo Gastrocnêmio de ratos Wistar.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Animais - Foram utilizados 60 ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus*), com 90 dias de vida, originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Grupos de 6 animais foram acomodados em gaiolas de propileno e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, com temperatura controlada entre 18 e 22°C, fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido, alimentados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 019/2004).

2.2. Período de adaptação - Os animais foram submetidos a um período de adaptação composto por três sessões semanais de 10 minutos de exercício em esteira rolante motorizada sem inclinação, com velocidade constante de 12 m/min, durante 2 semanas. Esta adaptação permitiu a separação dos animais que correriam e não correriam voluntariamente, os quais foram descartados (n=10), e não utilizados na obtenção dos dados deste trabalho.

2.3. Grupos Experimentais: Os animais selecionados após o período de adaptação foram divididos ao acaso em dois grandes grupos: Grupo controle (C) composto por animais sedentários (n=14) e Grupo Exercitado (E) por animais submetidos a sessões de treino (n=36).

Durante o período de treinamento, o grupo C foi colocado diariamente em contato com a esteira, pelo mesmo período dos animais exercitados, onde permaneceram em

repouso durante 10 minutos no intuito de desprezar o estresse proveniente da manipulação das cobaias.

O grupo E, anteriormente ao início do protocolo foi subdividido em dois grupos: Grupo exercitado 1 (E₁) (n=18) e grupo exercitado 2 (E₂) (n=18). Os animais do grupo E realizaram seis dias consecutivos de atividade física, sendo cada dia constituído por três sessões de exercício. Entre as sessões diárias de exercício o grupo E₁ foi submetido a um período de recuperação de 1 hora, distinto ao período de recuperação do grupo E₂ de 3 horas entre cada sessão de exercício. Os animais (n=6) do grupo E (E₁ e E₂) foram sacrificados no 1º (1ºd), 3º (3ºd) e 6º dia (6ºd) de exercício, logo após a terceira sessão do respectivo dia. Tais momentos foram escolhidos com o intuito de avaliar as alterações fisiológicas nos animais frente aos distintos períodos de recuperação.

2.4. Protocolo de exercício – O protocolo de exercício foi realizado em esteira rolante de acordo com estudos prévios do nosso laboratório (HOHL, FERRARESSO, DE OLIVEIRA, LUCCO, BREZIKOFER e DE MACEDO, 2009).

O protocolo de exercício está apresentado na Tabela 1. O exercício foi iniciado com os animais correndo em esteira sem inclinação com velocidade inicial de 12 m/min. A cada 2 minutos foi incrementado 1 m/min até atingir a velocidade de 20 m/min. A partir daí o acréscimo na velocidade da esteira passou a ser de 2 m/min a cada 3 minutos até que os animais atingissem a exaustão. O momento da exaustão foi determinado a partir do momento que os animais permaneciam por mais de 10 segundos próximos a grade eletrificada da esteira.

Tabela 1 - Teste de performance

Tempo (min)	Velocidade (m/min)
Início	12
2	13
4	14
6	15
8	16
10	17
12	18
14	19
16	20
18	22
21	24
24	26
...	...

2.5. Quantificação do desempenho – A *performance* dos animais foi determinada a partir do cálculo do trabalho mecânico realizado pelos mesmos em cada sessão diária de treino. O cálculo do trabalho levou em consideração a massa dos animais e a distância total percorrida no teste. Como a distância total “D” percorrida nos estágios $i = 1, 2, 3, 4...$ na velocidade V_i durante os tempos T_i é $D = \sum D_i = \sum V_i T_i$, podemos calcular uma grandeza relacionada ao trabalho mecânico realizado durante o teste multi-estágio (equação 1):

$$\text{Equação [1] } W = \sum W = m D$$

Onde: **(W)**, representa o trabalho mecânico total realizado pelo rato; **(m)** = massa; **(D)**= distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. W não é o trabalho mecânico definido pela física, mas uma quantificação proporcional ao trabalho. Ao envolver a massa

do animal esta variável W permite comparar os desempenhos dos ratos longitudinalmente. A grandeza W será expressa em Kg.m (HOHL, FERRARESSO, DE OLIVEIRA, LUCCO, BRENZIKOFER e DE MACEDO, 2009).

2.6. Obtenção das amostras - Os animais foram mortos em câmara de dióxido de carbono (CO₂) após a última sessão diária de exercício, de acordo com os dias estabelecidos pelo protocolo experimental. O sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos contendo anticoagulante EDTA/K3, e o plasma obtido após centrifugação a 3000g por 10min, foi armazenado a -80°C para futuros experimentos. Após punção cardíaca, os animais foram dissecados com material estéril, e fragmentos de aproximadamente 100mg da porção vermelha (GV) e branca (GB) do músculo esquelético gastrocnêmio, foram coletados, pesados e armazenados em tubos criogênicos a -80°C para as análises da expressão gênica das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9) e dos seus inibidores TIMP-1 e 2, além da atividade protéica e enzimática destas MMPs .

2.7. Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA) - O RNA total foi extraído a partir de 100mg das amostras de músculo esquelético (GV e GB). Os tecidos foram homogeneizados e purificados com Trizol® seguindo as recomendações do fabricante e as otimizações propostas por Chomczynski & Sacchi (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 2006). Os parâmetros de concentração e pureza foram avaliados no espectrofotômetro BioMate™ 3 (Thermo Electron, MA, EUA), na absorvância de 260nm e nas razões 260/280 e 260/230nm, respectivamente. A integridade da molécula foi avaliada em gel de agarose 1,5%. Posteriormente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de quantidades equivalentes de RNA total (1µg) de cada amostra, seguindo o protocolo do *kit* M-MLV

Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA). O cDNA foi quantificado e submetido a reação em cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) em tempo real usando o sistema de detecção StepOnePlus™ da Applied Biosystems. Anteriormente a síntese de cDNA, as amostras de RNA total foram pré-tratadas com Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA).

2.8. RT-PCR em tempo real - Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as especificações dos ensaios TaqMan® (Applied Biosystems, CA, EUA) para análise da expressão gênica e da metodologia do sistema de detecção. Os ensaios utilizados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Ensaios TaqMan ®

	Número do Ensaio
Gene Alvo	
<i>MMP-2</i>	Rn 01538171_m1
<i>MMP-9</i>	Rn 00579162_m1
<i>TIMP-1</i>	Rn 00587558_m1
<i>TIMP-2</i>	Rn 00573232_m1
Controle Endógeno	
<i>GAPDH</i>	Rn 99999916_s1
<i>β-ACTINA</i>	Rn 00667869_m1
<i>18S</i>	Hs 99999901_s1

Antes do início das reações de PCR todos os ensaios foram testados e as eficiências obtidas foram superiores a 90% (**Anexo I**). A reação de PCR foi composta por 200ng de cDNA, 10µL de Universal TaqMan® PCR Master mix, 1µL do ensaio TaqMan, composto pelos *primers forward* e *reverse* conjugados a uma sonda fluorescente e água Mili-Q para ajustar o volume da reação para 20µL. A dinâmica de termo-ciclagem utilizada foi de 40 ciclos, cada ciclo constituído de 15 seg a 95°C para desnaturação do cDNA e 1 min a 60°C para anelamento seguido de extensão.

O nível relativo de expressão gênica foi calculado de acordo com as recomendações contidas no boletim do usuário (P/N 4303859) da Applied Biosystems pelo método do CT (*cycle threshold*) comparativo para quantificação relativa. A média das duplicatas dos valores de CT, normalizadas a partir de um controle interno, foi utilizada para quantificar a expressão do gene alvo, obtendo assim o valor de ΔCT [(Expressão do Gene Alvo) – (Expressão do Controle endógeno)]. Em seguida foi obtido o valor de $\Delta\Delta CT$ [(ΔCt de um tempo experimental ou tratamento) – (ΔCt da amostra de referência ou controle)].

No atual trabalho, os dados representam modificações na expressão gênica com relação ao grupo controle (animal sedentário), normalizados com o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Vale ressaltar que testamos três diferentes genes como controle endógeno¹. O GAPDH em comparação com a β -Actina e o 18S, apresentou as

¹ São genes utilizados para normalização da reação de PCR. Um bom controle endógeno é definido comparando-se a expressão do gene no grupo controle e no grupo tratado. Aqueles ou aquele que apresentar a menor variação nos valores de expressão em relação ao controle é definido como um bom candidato a controle endógeno. Geralmente são genes que apresentam expressão constitutiva.

menores variações na expressão gênica em resposta ao tratamento empregado no estudo, quando comparado ao grupo controle.

A variação na expressão gênica, ou *fold increase* foi expresso pelo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A partir disso, os seguintes parâmetros limites propostos por Hu et al. (HU, QIAN, HU, SHOU, WANG, GIFFEN, WANG, WANG, GOLDSTEIN, EMMERT-BUCK e TAYLOR, 2006) foram aplicados:

- ✚ aumentos significativos na expressão gênica: *fold increase* $\geq 2,0$;
- ✚ ausência de alteração na expressão: $0,5001 \leq \textit{fold increase} \leq 1,9999$;
- ✚ diminuições significativas na expressão gênica: *fold increase* $\leq 0,500$

2.9. Zimografia – Fragmentos de 100mg do GV e GB foram triturados com o auxílio de um triturador Polytron (Kinematika) em tampão de extração (50mM Tris-HCl pH 7.4, 0,2M NaCl, 0,1% Triton, 10mM CaCl₂ e 1% de coquetel inibidor de proteases P8340 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).O conteúdo total de proteína foi mensurado de acordo com o método de BRADFORD (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica como proteína padrão.

A análise da atividade das MMPs 2 e 9 foi determinada por zimografia utilizando gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de gelatina. Aproximadamente 35µg de proteína de cada amostra foram aplicadas no gel. Após eletroforese, o gel foi lavado a temperatura ambiente com solução contendo Triton X-100 2.5% e incubado *overnight* em tampão 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl e 0.03% de azida sódica, a 37°C. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (Sigma). As bandas correspondentes à atividade gelatinolítica foram observadas após lavagem com solução contendo metanol 30% e de ácido acético 10%. Os géis foram avaliados pela densitometria das bandas com o programa Science Image

software [Scion Corporation, Frederick, MD, USA (http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm)].

2.10. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Utilizamos os kits de ELISA da marca R&D Systems (MN, USA) para quantificar os níveis totais das proteínas MMP-2 e 9. Para realizar os experimentos aplicamos em cada reação 60µg de proteína total, todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as especificações do fabricante a partir de anticorpos Monoclonais para as proteínas de interesse.

2.11. Análise Estatística - Os resultados, representados na forma de média e desvio-padrão ($X \pm DP$). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para três ou mais grupos com amostras não pareadas, sendo utilizado teste t Student para a comparação entre dois grupos específicos não pareados. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Desempenho dos animais ao longo dos 6 dias de exercícios

A Figura 4 mostra a somatória dos valores de *performance* (média \pm DP) dos animais do grupo E₁ (1h de pausa entre as sessões) e do grupo E₂ (3h de pausa entre as sessões) ao longo dos seis dias. A cada dia os animais realizaram 3 sessões de exercícios até a exaustão.

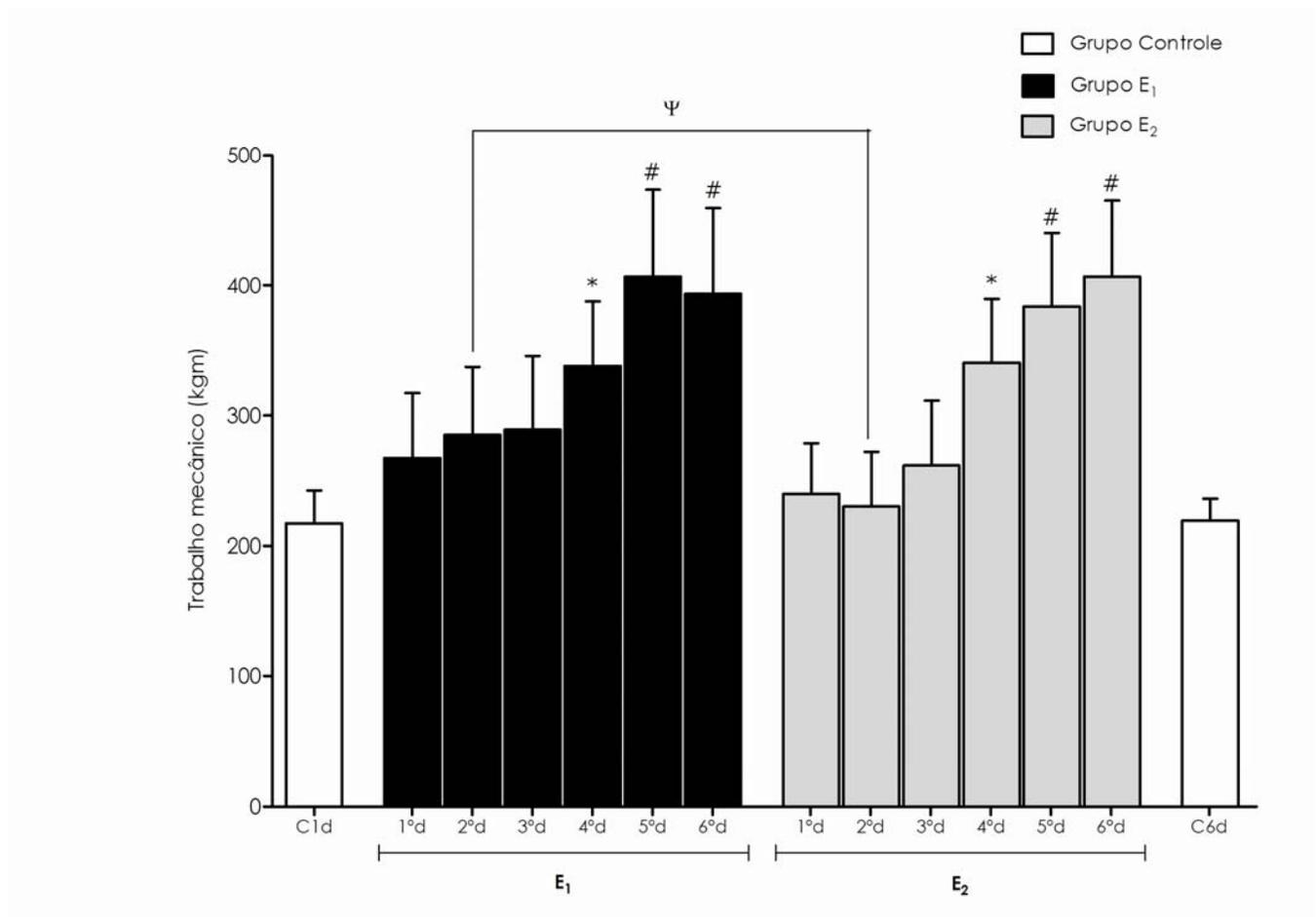


Figura 4. Desempenho dos animais dos grupos E₁ e E₂ submetidos a 3 sessões diárias de exercícios até a exaustão ao longo dos 6 dias.*Significativamente diferente do grupo C e dos dias 1ºd, 2ºd e 3ºd (p<0,05). #Significativamente diferente do grupo C e dos dias 1ºd, 2ºd, 3ºd e 4ºd (p<0,05). Ψ Diferença significativa entre o 2ºd do grupo E₁ vs E₂(p<0,05)

Houve um aumento significativo no desempenho após o 4º dia de sessões de treino em ambos os grupos. O desempenho aumentou ainda mais a partir do 5º dia ($p < 0,05$). No 6º dia os valores alcançados em ambos os grupos não se mostrou diferente do dia anterior. Vale ressaltar que não houve diferença entre os grupos no que concerne aos dados de trabalho mecânico, com exceção para o 2ºd de exercício.

3.2. Alterações na expressão gênica das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 e dos inibidores TIMP-1 e TIMP-2 ao longo das sessões de treino.

Os resultados relativos aos biomarcadores utilizados nesse estudo foram obtidos de amostras de músculo gastrocnêmio, porções vermelha e branca, coletadas e processadas após o 1ºd, 3ºd e 6ºd de treino, correspondente aos efeitos de 3, 9 e 18 sessões consecutivas de exercício incremental até a exaustão. A Figura 5 mostra as alterações na expressão gênica da MMP-2 nas porções: vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio.

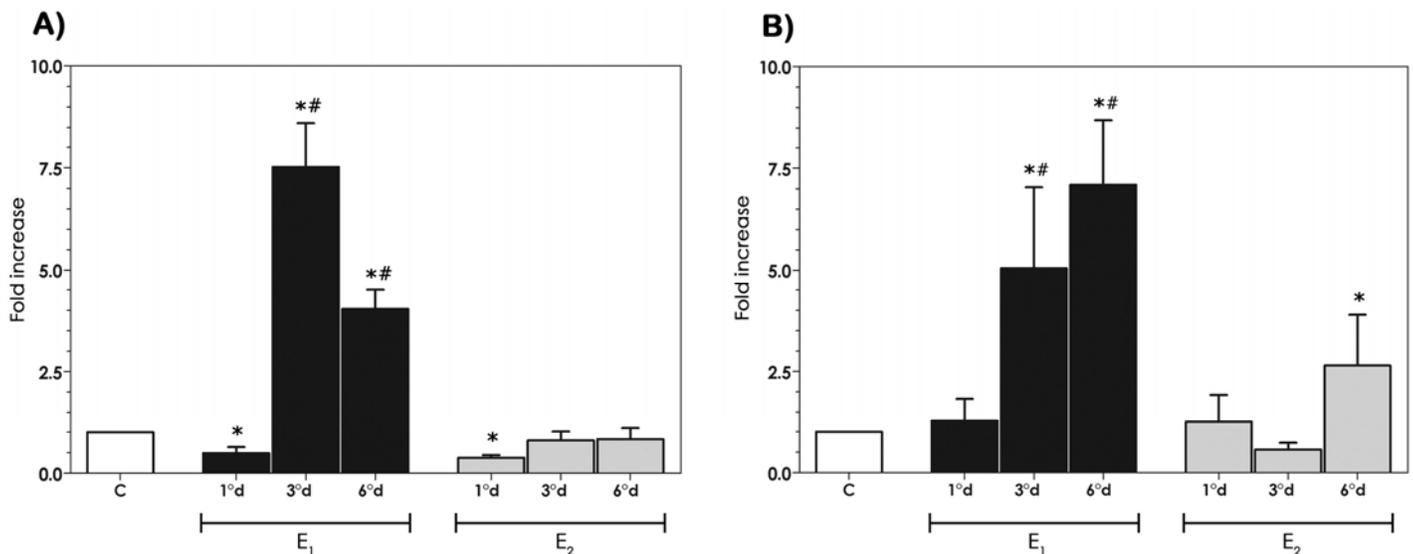


Figura 5. Análise da expressão gênica da metaloproteinase MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E2 ($p < 0,05$).

Houve um aumento significativo na expressão do RNA_m da MMP-2 nas porções vermelha e branca do músculo gastrocnêmio do grupo E₁ quando comparado aos grupos C e E₂. O pico de expressão na porção vermelha do músculo gastrocnêmio ocorreu após o 3ºd (*fold increase* = 7,0 ± 1,0), mantendo-se elevada significativamente no 6ºdia (*fold increase* = 4,0 ± 0,47). Já a porção branca do músculo gastrocnêmio apresentou pico de expressão gênica no 6ºdia (*fold increase* = 7 ± 0,71).

A Figura 6 apresenta as alterações na expressão gênica do inibidor TIMP-2 nas porções: vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio.

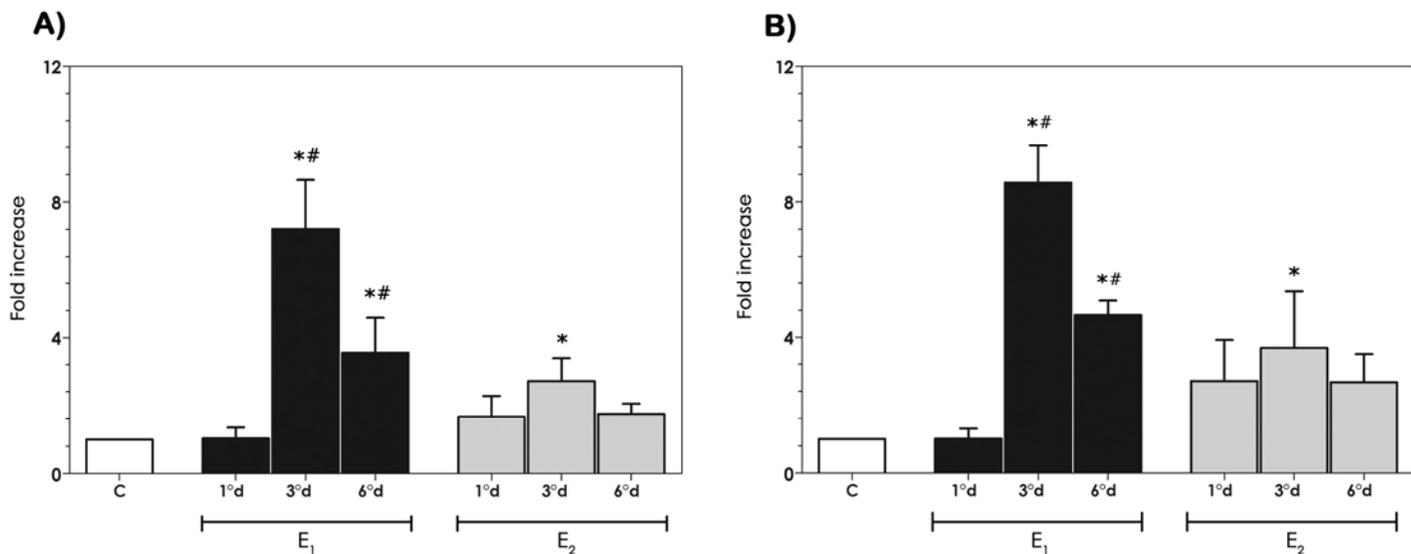


Figura 6. Análise da expressão gênica do TIMP 2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$)

Houve um aumento significativo na expressão do RNA_m do TIMP-2 similar ao observado na Figura 5. Muito mais pronunciado nos animais do grupo E₁ quando comparados aos do grupo E₂. O aumento na porção vermelha do músculo gastrocnêmio

(GV) ocorreu tanto após o 3ºd quanto após o 6º dia (*fold increase* = $7,0 \pm 1,4$ e $3,0 \pm 1,0$, respectivamente). A porção branca do músculo gastrocnêmio (GB) apresentou padrão similar de resposta, com pico para TIMP-2 no 3ºdia (*fold increase* = $8,0 \pm 1,0$ vezes), mantendo-se elevado ($4,0 \pm 0,4$ vezes) no 6º dia, quando comparado aos grupos C e E₂. Já o grupo E₂, mostrou um pequeno, porém significativo aumento no 3º dia em GV (*fold increase* = $2,7 \pm 0,7$) e GB (*fold increase* = $3,6 \pm 1,6$) com relação ao controle (Figura 6A e 6B, respectivamente).

A Figura 7 apresenta as alterações na expressão gênica da MMP-9 nas porções: vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio.

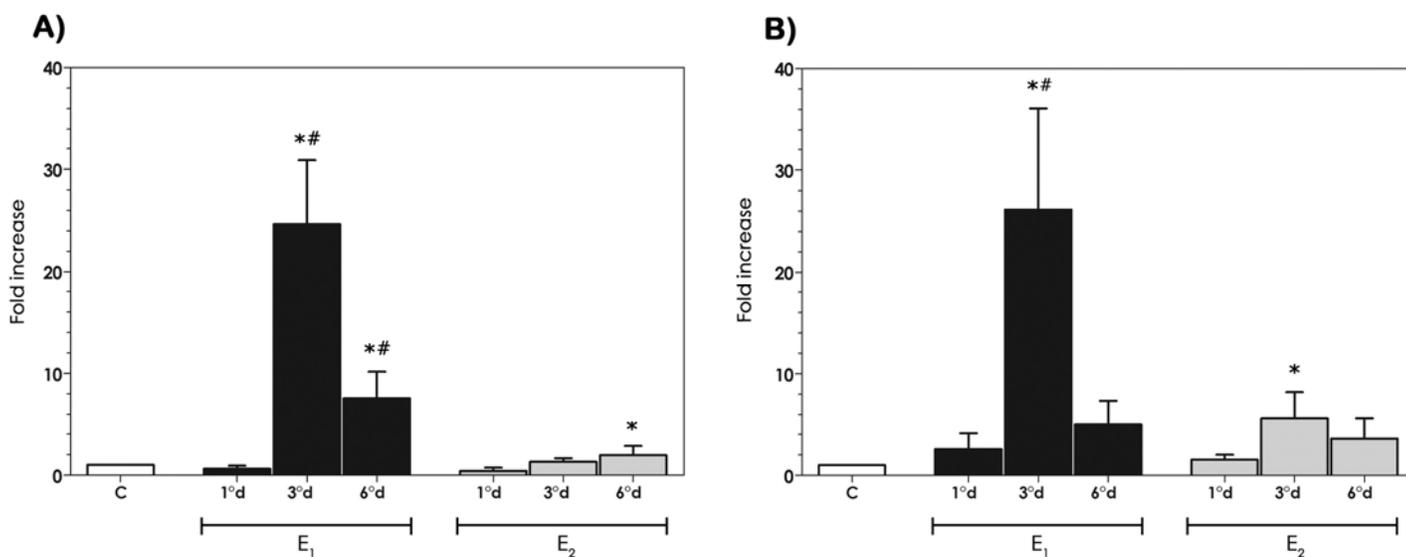


Figura 7. Análise da expressão gênica da metaloproteínase MMP-9 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$).

Novamente observamos um efeito muito mais pronunciado nos animais do grupo E₁ quando comparado ao E₂. Houve pico na expressão do gene no GV no 3ºdia em relação ao grupo E₂ e ao grupo C, porém de maior magnitude (*fold increase* de $24 \pm 2,7$ vezes) do

que a observada para MMP-2. O mesmo efeito foi observado no GB, com pico também no terceiro dia (*fold increase* = $26 \pm 4,4$ vezes). No Grupo E₂ houve apenas um aumento significativo no 6º dia no GV e no 3º dia no GB ($p < 0,05$).

A Figura 8 apresenta as alterações na expressão gênica do inibidor TIMP-1 nas porções: vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio.

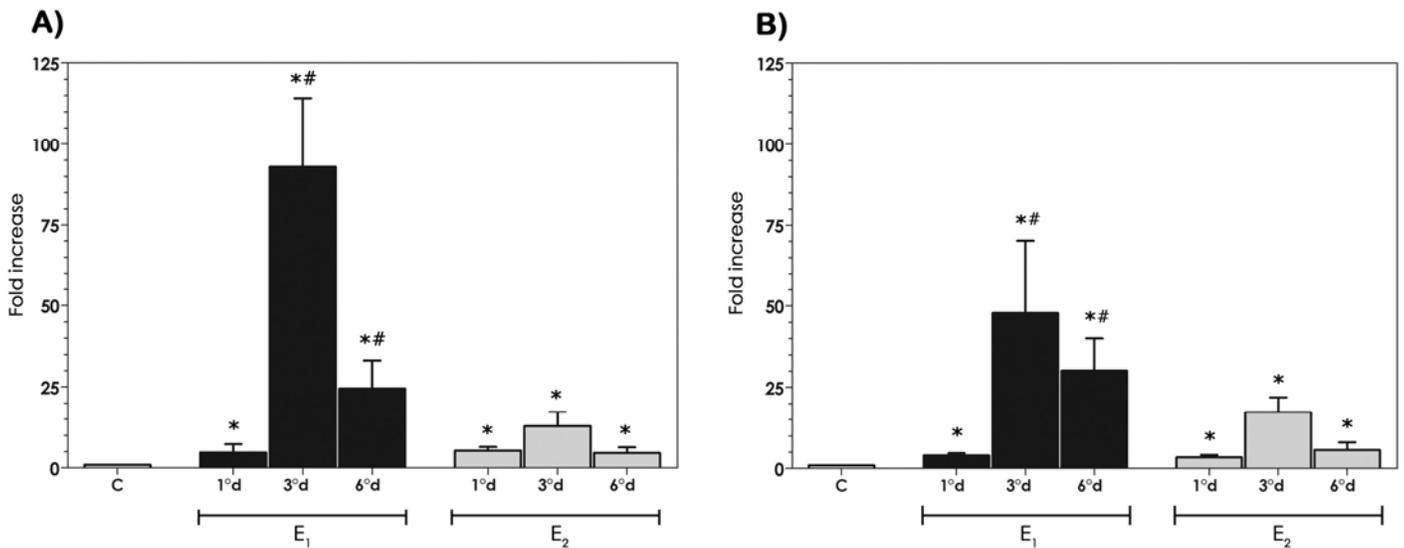


Figura 8. Análise da expressão gênica do TIMP 1 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$).

Houve comportamento similar no padrão de expressão do TIMP-1 para ambos os grupos (E₁ e E₂) no GV (Figura 8A), com aumento significativo em relação ao grupo controle. O grupo E₂ também exibiu aumento significativo no 1ºd (*fold increase* = $5,0 \pm 1,1$), 3ºd (*fold increase* = $12,0 \pm 4,2$) e no 6ºd (*fold increase* = $4,0 \pm 1,7$). Porém o grupo E₁ apresentou aumentos muito mais pronunciados, com diferença significativa no 3ºd e 6ºd (*fold increase* = $92,0 \pm 21,0$ e $24,0 \pm 8,6$, respectivamente) quando comparado a E₂.

A porção branca do músculo gastrocnêmio (Figura 8B) exibiu comportamento similar ao observado no GV. O grupo E₁ mostrou um aumento transiente para o TIMP-1 no 3ºd (*fold increase* = 48,0 ± 22 vezes), mantendo-se elevado (30,0 ± 10 vezes) no 6ºd. No grupo E₂, notaram-se alterações significativas na expressão do TIMP-1 nos 1ºd, 3ºd e 6ºd (p<0,05) em relação ao controle, porém em menor magnitude quando comparado a E₁.

3.3 Alterações na concentração protéica da MMP-2 ao longo dos seis dias de exercícios.

A Figura 9 apresenta as concentrações da proteína MMP-2 quantificadas por Elisa nas porções: vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos E₁ e E₂.

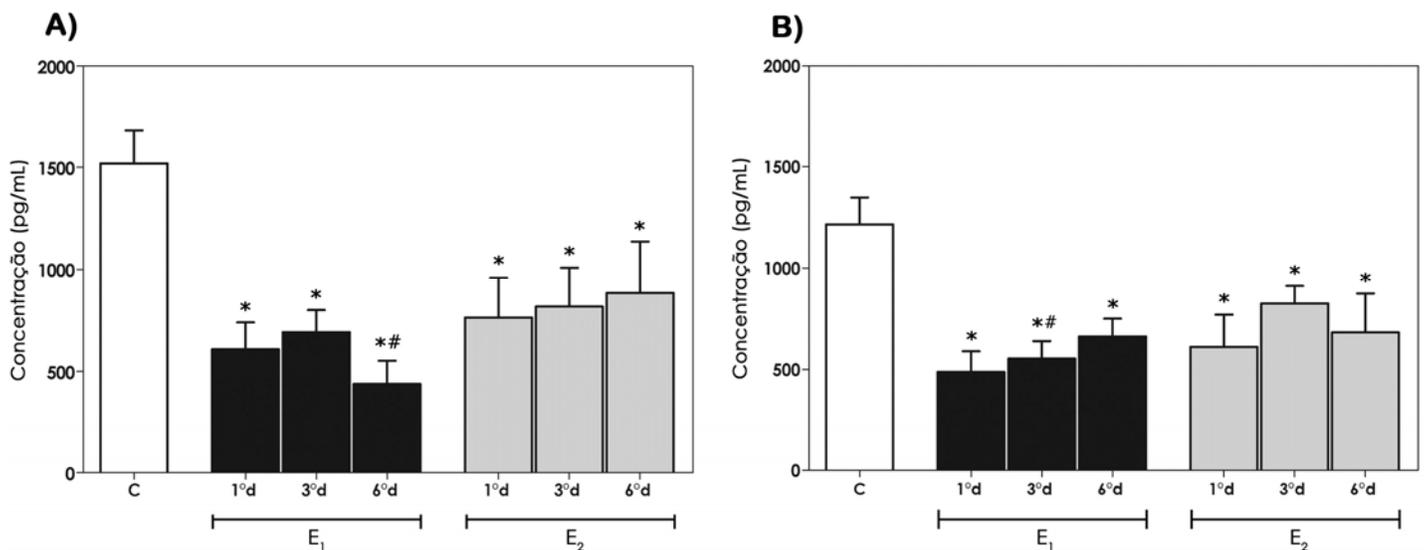


Figura 9. Concentração da metaloproteinase MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio. *Significativamente diferente do grupo C (p<0,05), #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ (p<0,05).

Houve diminuição significativa nas concentrações de MMP-2 em ambos os grupos, e em ambas as porções do músculo analisado (GV e GB) em relação ao grupo controle. É importante ressaltar, no entanto, que na porção vermelha, o grupo E₁ apresentou redução significativa no 6º dia ($p < 0,01$) comparado a E₂ (Figura 9A). Na porção branca do músculo gastrocnêmio também se observou uma redução mais acentuada no grupo E₁ no 3º dia ($p < 0,05$) (Figura 9B). Além disso, as diminuições na concentração da MMP-2 foram mais pronunciadas no GV em comparação ao GB, com uma maior redução no conteúdo protéico em relação ao grupo C. Já a presença da MMP-9 não foi detectada pela técnica de ELISA em nenhum dos grupos, e em nenhum dos momentos analisados.

3.4. Atividade da MMP-2 ao longo dos seis dias de exercícios.

A atividade das MMPs 2 e 9 foi analisada nos grupos E₁ e E₂, nas porções vermelha e branca do músculo gastrocnêmio, através da técnica de Zimografia.

Os resultados da zimografia das porções, vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio, e do tendão (C), utilizado nesse momento para efeito de comparação, estão apresentados na Figura 10.

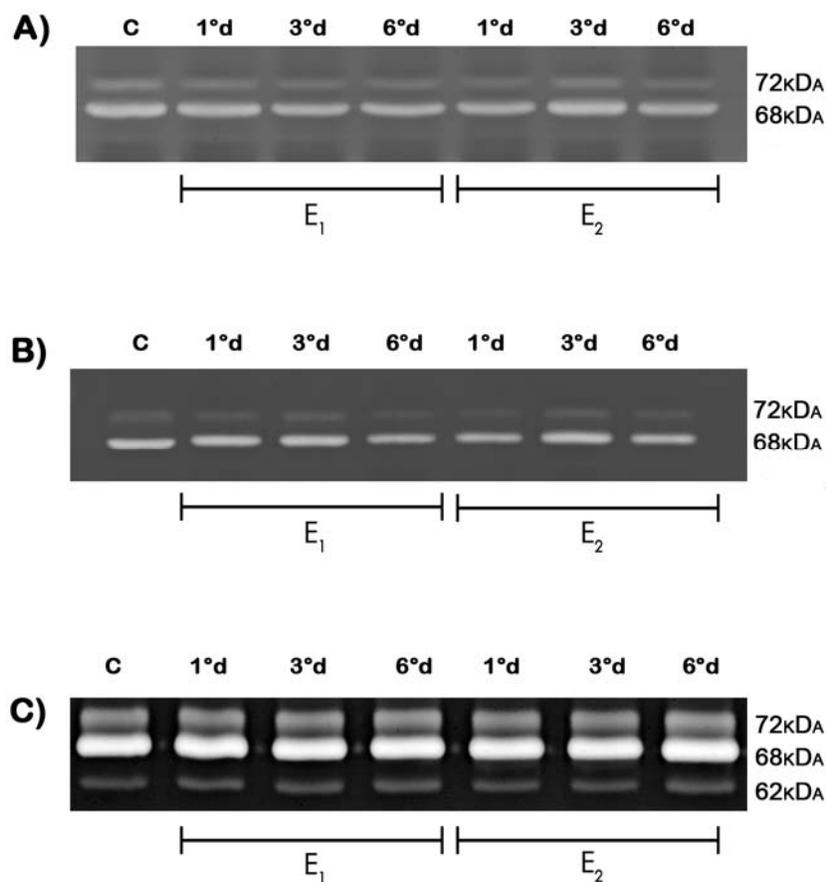


Figura 10. Gel de zimografia, detalhe para a atividade da MMP-2 nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio e tendão (C) para os grupos E₁ e E₂.

Não foi possível detectar atividade gelatinolítica da MMP-9 em nenhuma das porções analisadas do músculo gastrocnêmio. No GV e GB também não detectamos a forma ativa da MMP-2 (72kDa). Somente o tendão apresentou a forma ativa da MMP-2, comprovando que a padronização da técnica foi adequada.

A Figura 11 apresenta a quantificação das formas latente e intermediária nas porções vermelha (A e C, respectivamente) e branca (B e D, respectivamente) do músculo gastrocnêmio, para os animais do grupo E₁ e E₂.

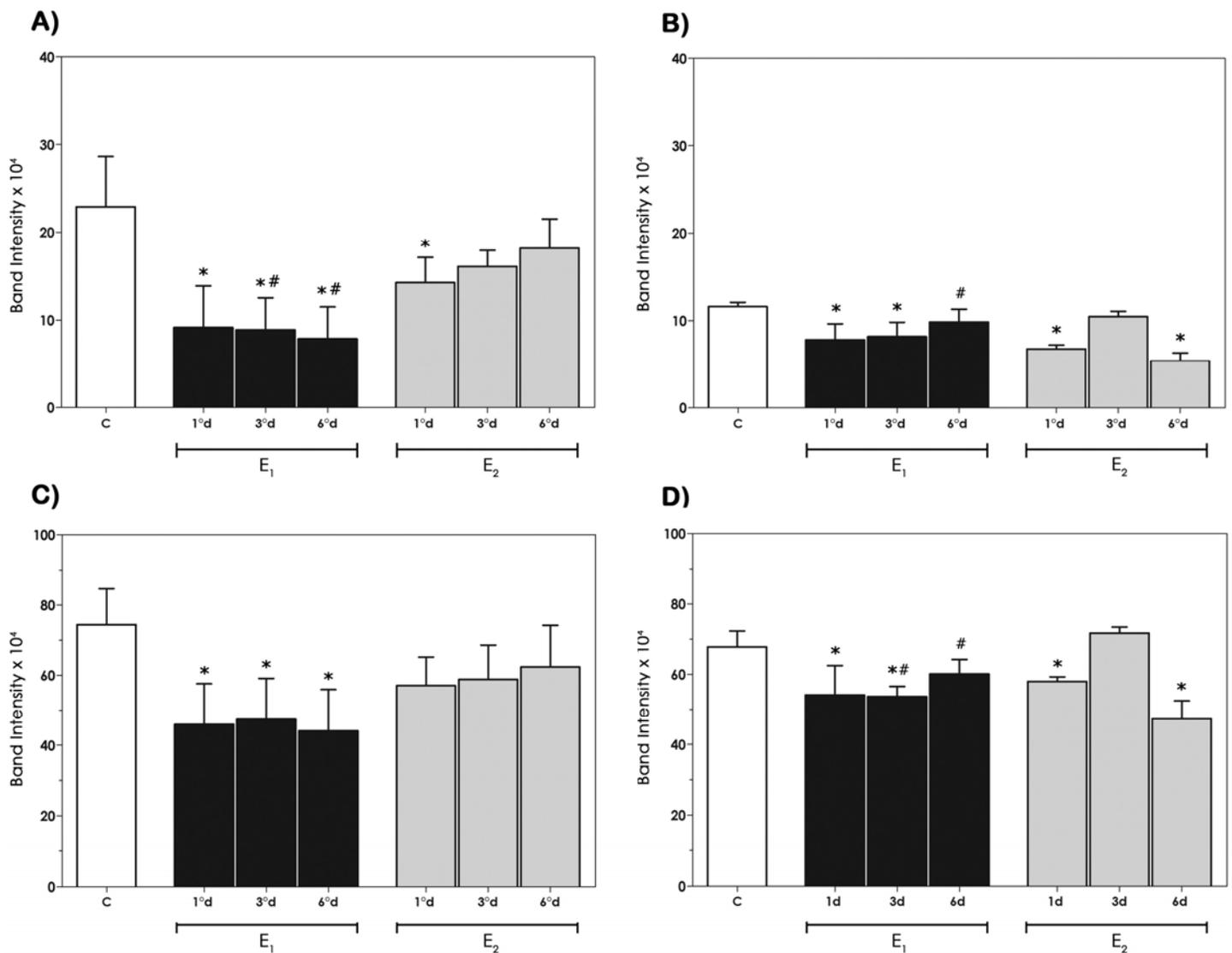


Figura 11. Atividade da MMP-2, forma latente nas porções vermelha (A) e branca (B) do músculo gastrocnêmio para os grupos E₁ e E₂ e da forma intermediária no GV (C) e GB (D). *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do mesmo tempo experimental no grupo E₂ ($p < 0,05$).

Podemos observar que o grupo E₁ apresentou reduções significativas ($p < 0,01$) na atividade gelatinolítica das isoformas latente (72kDa) e intermediária (68 kDa) da MMP-2 na porção vermelha do músculo gastrocnêmio (Figura 11A e 11C, respectivamente) ao longo

de todos os momentos estudados quando comparados ao grupo C e ao grupo E₂. No grupo E₂, também observou-se uma redução, porém não significativa ($p > 0,05$) em relação ao grupo C nos dias 1º, 3º e 6º, para a isoforma latente e intermediária da MMP-2. Com relação à MMP-9, não verificamos a presença de bandas correspondentes a atividade dessa proteína em E₁ e E₂, para ambas as porções do músculo analisado.

O músculo GB de ambos os grupos, E₁ e E₂, apresentaram reduções significativas ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle em todos os momentos analisados para ambas as isoformas, latente (72kDa) e intermediária (68 kDa) da MMP-2 (Figura 11B e 11D, respectivamente). No grupo E₂ verificamos diminuições no 1ºd e 6ºdia ($p < 0,01$), já no grupo E₁ as alterações ocorreram no 1º e 3ºdia ($p < 0,01$). Também não foi identificada a presença de atividade gelatinolítica para MMP-9 na porção branca do músculo gastrocnêmio.

4. DISCUSSÃO

Programas diferenciados de atividade física têm mostrado padrões distintos de resposta no sistema das MMPs, acarretando diferentes adaptações no *turnover* do tecido muscular esquelético (CARMELI, MOAS *et al.*, 2005; RULLMAN, RUNDQVIST, WAGSATER, FISCHER, ERIKSSON, SUNDBERG, JANSSON e GUSTAFSSON, 2007; BARNES, SZELENYI, WARREN e URSO, 2009; RULLMAN, NORRBOM, STROMBERG, WAGSATER, RUNDQVIST, HAAS e GUSTAFSSON, 2009).

Quando delineamos o protocolo experimental, nossa hipótese era que exercícios realizados até a exaustão com grande volume (3 sessões diárias) e pausa muito pequena entre as sessões de exercício, representado pelo grupo E₁, poderiam proporcionar um estresse mecânico muito intensificado, que acarretaria danos maiores ao tecido e perda do controle entre a ação coordenada da função gelatinolítica das MMPs 2 e 9 e do papel inibitório dos TIMPs 1 e 2. Isso resultaria em proteólise excessiva, e conseqüentemente, queda da *performance* do grupo E₁.

Os dados apresentados nesse estudo mostraram que nossa hipótese não se confirmou. Ambos os grupos se adaptaram positivamente ao protocolo de exercício, independente do tempo de pausa entre as sessões diárias de exercício. Tanto o grupo E₁ quanto o grupo E₂ exibiram aumento significativo e similar no desempenho (82 e 87%, respectivamente) após os 6 dias de três sessões diárias de exercícios até a exaustão. Até o 3º dia, no entanto, o desempenho de ambos os grupos, não foi diferente dos animais do grupo controle, analisados no 1º ou 6º dia, sugerindo que esse foi o momento de maior resposta adaptativa em ambos os grupos. Embora seja escasso os estudos que envolvam a

análise da *performance* em paralelo as adaptações biológicas, a literatura mostra que os biomarcadores encontram-se fortemente alterados principalmente do 2º ao 4º dia após exercício físico (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001; KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002; MACKEY, DONNELLY, TURPEENIEMI-HUJANEN e ROPER, 2004).

A integridade da matriz diante do estímulo mecânico é mantida através da síntese e degradação das enzimas proteolíticas (MMPs), que desempenham papel fundamental no processo de degradação e remodelamento da matriz extracelular (GEORGE e DWIVEDI, 2004; COLLINS, RAMAMOORTHY, DA SILVEIRA, PATSTON e MAO, 2005). O controle da ação das MMPs sobre os componentes da matriz extracelular é feito pelos inibidores TIMPs e α -2-macroglobulina, evitando assim quadros de excessiva proteólise (LAMBERT, DASSE *et al.*, 2004). Todavia, pouco se sabe ainda como ocorre a integração entre a expressão e a síntese de componentes específicos da matriz extracelular e as adaptações na função mecânica do tecido muscular frente a diferentes protocolos de exercício físico (VIIDIK, 1973).

Os dados apresentados nesse trabalho mostraram que as respostas dos biomarcadores foram similares no que concernem as diferentes porções utilizadas do músculo gastrocnêmio. A porção vermelha (GV) com predominância de fibras do tipo I e IIa (metabolismo oxidativo) e porção branca (GB), com predominância de fibras IIb (metabolismo anaeróbico láctico e alático). Esses dados estão em concordância com os estudos de CARMELI e COLABORADORES (2005), que submeteram animais à corrida em esteira sem inclinação com diferentes intensidades alta intensidade 32m/min e baixa intensidade 18 m/min durante o período de 2 semanas, e observaram alterações mais perceptíveis apenas nos músculos com predominância de fibras do tipo II, principalmente no exercício de alta intensidade (CARMELI, MOAS *et al.*, 2005). Outro estudo, envolvendo

protocolo de corrida em declive encontrou alterações mais acentuadas para os músculos com predominância de fibras tipo I (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001). O protocolo utilizado no presente estudo, considerando que os exercícios foram feitos sempre até a exaustão, pode portanto ter contribuído para a solicitação de ambos os tipos de fibras.

Quando comparamos os dois grupos, diferenciados em relação ao tempo de pausa entre as sessões diárias observamos que os efeitos sobre os biomarcadores foram sempre de maior magnitude no grupo E₁ quando comparado ao grupo E₂ (Figura 5 a 11). Além disso, o aumento na expressão do RNAm para pró MMP-9 foi de maior magnitude que a do pró-MMP-2 (Figuras 5 e 7).

Outros estudos mostraram aumentos nos níveis de RNAm da pró MMP-2 após protocolos de exercício (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001; KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002; CARMELI, MOAS *et al.*, 2005; RULLMAN, NORRBOM *et al.*, 2009). Protocolos de imobilização (CARMELI, HAIMOVITCH e NEMCOVSKY, 2006) e desnervação (ZIMOWSKA, BRZOSKA *et al.*, 2008) também mostraram aumento nos níveis de expressão da pró MMP-2, sugerindo um intenso e acelerado aumento no remodelamento das proteínas da matriz extracelular, dentre as quais, o colágeno recebeu grande enfoque (KOSKINEN, HOYHTYA, TURPEENNIEMI-HUJANEN, MARTIKKALA, MAKINEN, OKSA, RINTAMAKI, LOFBERG, SOMER e TAKALA, 2001; KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002).

Embora as proteínas MMPs 2 e 9 apresentem capacidade de degradar substratos semelhantes, observam-se padrões distintos na expressão e regulação transcricional dessas MMPs (ZIMOWSKA, BRZOSKA *et al.*, 2008). O gene da MMP-2 é expresso constitutivamente, sendo modestamente regulado pela secreção de citocinas e fatores de crescimento. Já o

gene da MMP-9 não apresenta expressão constitutiva em condições normais. Todavia, a região promotora do gene contém diversos elementos, como a seqüência TATA-BOX, altamente sensíveis a uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento, sendo assim mais fortemente regulada em comparação a MMP-2 (YAN e BOYD, 2007).

Note que o pico de aumento na expressão da pró MMP-2 e MMP-9 foi após o 3º dia de exercícios, representativo do efeito cumulativo de 9 sessões de treino sem o correspondente efeito adaptativo positivo sobre o desempenho. Nossos dados sugerem que a pausa de 1 h (grupo E₁), principalmente nesse momento promoveu alterações mais intensas na integridade da matriz. O maior período recuperativo entre as sessões do grupo de animais E₂ parece ter sido eficiente para uma resposta menos acentuada na expressão de RNAm para pró MMP-2 e 9.

As alterações mais intensas nos biomarcadores analisados no grupo E₁ poderiam explicar as adaptações no tecido em resposta ao acúmulo de cargas, que culminaram no desempenho similar entre os animais dos grupos E₁ e E₂, mesmo em regimes distintos de magnitude de carga.

Curiosamente, apesar da expressão gênica aumentada, registramos como efeito adaptativo intramuscular uma diminuição na atividade da MMP-2 isoformas latente e intermediária e ausência da forma ativa; acompanhada por uma diminuição significativa nas concentrações de MMP-2 em ambas as porções do músculo gastrocnêmio e grupos experimentais. Embora essa diminuição também tenha sido mais pronunciada no grupo E₁, somente a zimografia do tendão calcâneo dos mesmos animais sacrificados para a avaliação do músculo gastrocnêmio mostrou a forma ativa da MMP 2. Isso elimina a

possibilidade de artefatos na extração das proteínas e na execução da zimografia das amostras de músculo.

Dados da literatura envolvendo a análise da atividade das diferentes isoformas da MMP-2 através de zimografia demonstraram ativação dos pró-zimogênios em resposta a diferentes protocolos de exercício físico (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001; KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002; MARQUETI, PRESTES, PASCHOAL, RAMOS, PEREZ, CARVALHO e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2008; MARQUETI, PRESTES, STOTZER, PASCHOAL, LEITE, PEREZ e SELISTRE DE ARAÚJO, 2008; RULLMAN, NORRBOM *et al.*, 2009). Foi observado aumento na atividade da pró MMP-2 em músculos com diferentes predomínios de fibras em animais submetidos a 130 min de exercício em esteira com - 13,5° de inclinação (KOSKINEN, HOYHTYA *et al.*, 2001). Contudo, é importante ressaltar que a presença de bandas correspondentes à isoforma ativa da MMP-2 foi observada apenas em um dos três músculos analisados, onde predominava as fibras do tipo I (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001).

Estudos sobre a influência de contrações musculares forçadas no músculo tibial anterior na atividade da MMP-2 verificaram aumento na atividade gelatinolítica da pró MMP-2 nos dias 2, 4 e 7 após o término do exercício físico. A presença da isoforma ativa foi observada no 4° e 7° dia após o estímulo (KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002). Contrariamente, RULLMAN E COLABORADORES (2009), utilizando exercício em cicloergômetro em humanos não demonstraram alterações na atividade da pró MMP-2 (RULLMAN, NORRBOM *et al.*, 2009).

Apesar do grande aumento observado na expressão da MMP-9 no grupo E₁, também não constatamos a presença de bandas na zimografia correspondentes as atividades da

MMP-9 isoformas latente ou ativa em nenhum dos momentos analisados, para nenhum dos grupos, em concordância com outros estudos (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001; KOSKINEN, AHTIKOSKI *et al.*, 2002; CARMELI, MOAS *et al.*, 2005). Contrariamente RULLMAN E COLABORADORES (2007), analisando fragmentos do músculo vasto lateral de humanos detectaram através da zimografia a presença de bandas correspondentes à atividade das isoformas da MMP-9. Porém, não se pode desprezar o possível efeito dos procedimentos invasivos realizados no estudo, que podem ter alterado a atividade dessa proteína . Ou durante a coleta de sangue a partir de cateteres inseridos na artéria e veia femoral, ou na biópsia realizada em diferentes tempos após o término do exercício para coleta de fragmentos do músculo vasto lateral (RULLMAN, RUNDQVIST *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que a análise da concentração de MMP 9 pela técnica de ELISA também não detectou a presença dessa proteína em nenhuma das porções analisadas do músculo gastrocnêmio e em nenhum dos momentos analisados quer em E₁ e E₂, reforçando os resultados obtidos na zimografia. Assim como na atividade da MMP-2 ativa, as bandas correspondentes as isoformas da MMP-9 também foram encontradas apenas no tendão calcâneo dos mesmos animais sacrificados para análise do músculo gastrocnêmio.

Estudos sugerem que a presença da MMP-9 no tecido muscular depende da severidade dos danos ao tecido (KOSKINEN, WANG *et al.*, 2001), todavia a maioria dos protocolos envolvendo condições normais de exercício falhou em mostrar atividade da MMP-9 pela técnica de zimografia. Nesse contexto, a presença da MMP-9 no tecido muscular esquelético em resposta ao exercício foi observada apenas em estudos que utilizaram a aplicação de exercício em baixíssimas temperaturas (KOSKINEN, HOYHTYA *et al.*,

2001); ou com restrição do fluxo sanguíneo ao tecido através de torniquetes, onde a oclusão dos vasos favorece e intensifica o mecanismo de isquemia e reperfusão no tecido (RULLMAN, NORRBOM *et al.*, 2009). A presença de MMP-9 também foi detectada em protocolos de imobilização, desnervação e miopatias inflamatórias (SCHOSER, BLOTTNER e STUERENBURG, 2002; REZNICK, MENASHE, BAR-SHAI, COLEMAN e CARMELI, 2003; ZIMOWSKA, BRZOSKA *et al.*, 2008) .

Uma provável explicação para a diminuição na quantidade de MMP-2 e ausência de MMP-9 muscular em todos os momentos analisados seria um efeito inibitório acentuado exercido pelo TIMPs 1 e 2, que contribuiria para o clearance rápido dessa proteína e a consequente diminuição quantitativa e qualitativa observada. Note que mesmo no grupo E₂, onde o aumento na expressão do RNAm da pró MMP-2 e MMP-9 não foi significativo em todos os momentos e sempre de magnitude muito menor quando comparado ao grupo E₁ houve aumento significativo na expressão dos RNAs mensageiros dos TIMPs 1 e 2 (Figuras 6 e 8). Vale ressaltar que o TIMP-1 apresentou, assim como a MMP-9, maiores níveis de expressão gênica quando comparado ao TIMP-2, responsável preferencialmente pela inibição da MMP-2.

A literatura aponta que anterior ao efeito inibitório do TIMP-2 ocorre a formação de um complexo entre MMP-2, MMP-14 e TIMP-2 que favorece a ativação da MMP-2 pelas MMPs da superfície celular (MMP-14). No entanto, a ativação ou inibição da MMP-2 pelo complexo depende do nível de inibidor presente no ambiente, dessa forma o excesso de TIMP-2 previne essa ativação e favorece a inibição (STRONGIN, COLLIER *et al.*, 1995; BUTLER, BUTLER, ATKINSON, WILL, TAMURA, SCHADE VAN WESTRUM, CRABBE, CLEMENTS, D'ORTHO e MURPHY, 1998; KINOSHITA, SATO, OKADA, OHUCHI, IMAI, OKADA e SEIKI, 1998). A MMP-9

também forma complexos com o TIMP-1, embora seu significado biológico ainda não esteja esclarecido sugestão é de um potencial efeito inibitório sobre as MMPs (GOMEZ, ALONSO *et al.*, 1997).

A sugestão feita nesse estudo, de eliminação mais rápida das MMPs quando complexadas com TIMPs ainda não teve evidencia experimental comprovada. No entanto, é sabido que a α -2-macroglobulina, outro inibidor endógeno de MMPs também forma complexos, sendo esse complexo mais rapidamente removido pelo receptor (lipoproteína de baixa densidade relacionado à proteína 1).

5. CONCLUSÕES

O protocolo agudo de exercícios com duração de 6 dias e 3 sessões diárias até a exaustão utilizado nesse estudo induziu um aumento significativo no desempenho dos animais, independente do tempo de pausa entre as sessões. O efeito adaptativo observado nas MMPs 2 e 9 das porções vermelha (GV) e branca (GB) do músculo gastrocnêmio foi de diminuição quantitativa e qualitativa, principalmente da MMP-2, para ambos os grupos. Provavelmente o aumento significativo na expressão gênica tanto das MMPs 2 e 9 quanto TIMPs 1 e 2 no grupo E₁, principalmente após o terceiro dia, quando a performance ainda não tinha se alterado, permitiu um remodelamento acelerado na matriz extracelular do músculo gastrocnêmico, que possibilitou a melhora significativa no desempenho.

Do ponto de vista fisiológico, considerando que ambos os tempo de pausa foram igualmente eficientes para aumentar a *performance*, seria melhor utilizar uma pausa de 3h entre as sessões. O processo de sinalização de síntese protéica é um processo que demanda grande quantidade de energia, e que depende da oferta de nutrientes em quantidade e qualidade adequada para a resposta positiva.

6. REFERÊNCIAS

AHTIKOSKI, A. M., E. M. RISO, S. O. KOSKINEN, J. RISTELI e T. E. TAKALA. **Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise.** *Pflugers Arch*, v.448, n.1, Apr, p.123-30. 2004.

ALLBROOK, D. **Skeletal muscle regeneration.** *Muscle Nerve*, v.4, n.3, May-Jun, p.234-45. 1981.

BARNES, B. R., E. R. SZELENYI, G. L. WARREN e M. L. URSO. **Alterations in mRNA and Protein Levels of Metalloproteinases-2,-9 and-14 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 post- Traumatic Skeletal Muscle Injury.** *Am J Physiol Cell Physiol*, Sep 30. 2009.

BASSEL-DUBY, R. e E. N. OLSON. **Signaling pathways in skeletal muscle remodeling.** *Annu Rev Biochem*, v.75, p.19-37. 2006.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

BROOKS, S. V. **Current topics for teaching skeletal muscle physiology.** *Adv Physiol Educ*, v.27, n.1-4, Dec, p.171-82. 2003.

BULLER, A. J., J. C. ECCLES e R. M. ECCLES. **Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb.** *J Physiol*, v.150, Feb, p.399-416. 1960a.

_____. **Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses.** *J Physiol*, v.150, Feb, p.417-39. 1960b.

BUTLER, G. S., M. J. BUTLER, S. J. ATKINSON, H. WILL, T. TAMURA, S. SCHADE VAN WESTRUM, T. CRABBE, J. CLEMENTS, M. P. D'ORTHO e G. MURPHY. **The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.** *J Biol Chem*, v.273, n.2, Jan 9, p.871-80. 1998.

CARMEI, E., T. G. HAIMOVITCH e C. E. NEMCOVSKY. **Expression of matrix metalloproteinase 2 and heat shock protein-72 in immobilized muscle in rats.** *J Musculoskelet Neuronal Interact*, v.6, n.1, Jan-Mar, p.96-102. 2006.

CARMELI, E., M. MOAS, S. LENNON e S. K. POWERS. **High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres.** Exp Physiol, v.90, n.4, Jul, p.613-9. 2005.

CARMELI, E., M. MOAS, A. Z. REZNICK e R. COLEMAN. **Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review.** Muscle Nerve, v.29, n.2, Feb, p.191-7. 2004.

CHAKRABORTI, S., M. MANDAL, S. DAS, A. MANDAL e T. CHAKRABORTI. **Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.** Mol Cell Biochem, v.253, n.1-2, Nov, p.269-85. 2003.

CHARGE, S. B. e M. A. RUDNICKI. **Cellular and molecular regulation of muscle regeneration.** Physiol Rev, v.84, n.1, Jan, p.209-38. 2004.

CHOMCZYNSKI, P. e N. SACCHI. **The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on.** Nat Protoc, v.1, n.2, p.581-5. 2006.

COLLINS, J. M., K. RAMAMOORTHY, A. DA SILVEIRA, P. PATSTON e J. J. MAO. **Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses.** J Biomech, v.38, n.3, Mar, p.485-92. 2005.

DUBOWITZ, V. e A. G. PEARSE. **A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle.** Z Zellforsch Microsk Anat Histochem, v.2, p.105-17. 1960.

ENGEL, W. K. **The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. 1962.** Neurology, v.51, n.3, Sep, p.655 and 17 pages following. 1962.

FILIPPIN, L. I., A. J. MOREIRA, N. P. MARRONI e R. M. XAVIER. **Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury.** Nitric Oxide, v.21, n.3-4, Nov-Dec, p.157-63. 2009.

FOIDART, M., J. M. FOIDART e W. K. ENGEL. **Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle.** Arch Neurol, v.38, n.3, Mar, p.152-7. 1981.

FRIDEN, J. e R. L. LIEBER. **Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components.** Acta Physiol Scand, v.171, n.3, Mar, p.321-6. 2001.

- GEORGE, S. J. e A. DWIVEDI. **MMPs, cadherins, and cell proliferation.** Trends Cardiovasc Med, v.14, n.3, Apr, p.100-5. 2004.
- GIBALA, M. J., S. A. INTERISANO, M. A. TARNOPOLSKY, B. D. ROY, J. R. MACDONALD, K. E. YARASHESKI e J. D. MACDOUGALL. **Myofibrillar disruption following acute concentric and eccentric resistance exercise in strength-trained men.** Can J Physiol Pharmacol, v.78, n.8, Aug, p.656-61. 2000.
- GOMEZ, D. E., D. F. ALONSO, H. YOSHIJI e U. P. THORGEIRSSON. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** Eur J Cell Biol, v.74, n.2, Oct, p.111-22. 1997.
- GROUND, M. D., J. K. MCGEACHIE, M. J. DAVIES, L. M. SOROKIN e M. A. L. MALEY. **The expression of extracellular matrix during adult skeletal muscle regeneration: how the basement membrane, interstitium and myogenic cells collaborate.** BAM-PADOVA, v.8, p.129-142. 1998.
- GROUND, M. D., J. D. WHITE, N. ROSENTHAL e M. A. BOGOYEVITCH. **The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v.50, n.5, p.589. 2002.
- HAEUSLER, G., I. WALTER, M. HELMREICH e M. EGERBACHER. **Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation.** Calcif Tissue Int, v.76, n.5, May, p.326-35. 2005.
- HASTY, K. A., T. F. POURMOTABBED, G. I. GOLDBERG, J. P. THOMPSON, D. G. SPINELLA, R. M. STEVENS e C. L. MAINARDI. **Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases.** J Biol Chem, v.265, n.20, Jul 15, p.11421-4. 1990.
- HAWKE, T. J. **Muscle stem cells and exercise training.** Exercise and sport sciences reviews, v.33, n.2, p.63. 2005.
- HAWKE, T. J. e D. J. GARRY. **Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology.** Journal of Applied Physiology, v.91, n.2, p.534. 2001.

HOHL, R., R. L. FERRARESSO, R. B. DE OLIVEIRA, R. LUCCO, R. BRENZIKOFER e D. V. DE MACEDO. **Development and characterization of an overtraining animal model.** *Med Sci Sports Exerc*, v.41, n.5, May, p.1155-63. 2009.

HORNBERGER, T. A. e S. CHIEN. **Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle.** *J Cell Biochem*, v.97, n.6, Apr 15, p.1207-16. 2006.

HORNBERGER, T. A., W. K. CHU, Y. W. MAK, J. W. HSIUNG, S. A. HUANG e S. CHIEN. **The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, n.12, Mar 21, p.4741-6. 2006.

HORNBERGER, T. A., R. STUPPARD, K. E. CONLEY, M. J. FEDELE, M. L. FIOROTTO, E. R. CHIN e K. A. ESSER. **Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism.** *Biochem J*, v.380, n.Pt 3, Jun 15, p.795-804. 2004.

HORNBERGER, T. A., K. B. SUKHIJA e S. CHIEN. **Regulation of mTOR by mechanically induced signaling events in skeletal muscle.** *Cell Cycle*, v.5, n.13, Jul, p.1391-6. 2006.

HU, N., L. QIAN, Y. HU, J. SHOU, C. WANG, C. GIFFEN, Q. WANG, Y. WANG, A. M. GOLDSTEIN, M. EMMERT-BUCK e P. R. TAYLOR. **Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of SPARC, FADD, Fascin, COL7A1, CK4, TGM3, ECM1, PPL and EVPL in esophageal squamous cell carcinoma.** *BMC Cancer*, v.6, n.33, p.1-9. 2006.

KADI, F., N. CHARIFI, C. DENIS, J. LEXELL, J. L. ANDERSEN, P. SCHJERLING, S. OLSEN e M. KJAER. **The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies?** *Pflugers Arch*, v.451, n.2, Nov, p.319-27. 2005.

KHERIF, S., C. LAFUMA, M. DEHAUPAS, S. LACHKAR, J. G. FOURNIER, M. VERDIERE-SAHUQUE, M. FARDEAU e H. S. ALAMEDDINE. **Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles.** *Dev Biol*, v.205, n.1, Jan 1, p.158-70. 1999.

KINOSHITA, T., H. SATO, A. OKADA, E. OHUCHI, K. IMAI, Y. OKADA e M. SEIKI. **TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads.** J Biol Chem, v.273, n.26, Jun 26, p.16098-103. 1998.

KJAER, M. **Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading.** Physiol Rev, v.84, n.2, Apr, p.649-98. 2004.

KOSKINEN, S. O., A. M. AHTIKOSKI, J. KOMULAINEN, M. K. HESSELINK, M. R. DROST e T. E. TAKALA. **Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle.** Pflugers Arch, v.444, n.1-2, May, p.59-72. 2002.

KOSKINEN, S. O., M. HOYHTYA, T. TURPEENNIEMI-HUJANEN, V. MARTIKKALA, T. T. MAKINEN, J. OKSA, H. RINTAMAKI, M. LOFBERG, H. SOMER e T. E. TAKALA. **Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running.** Scand J Med Sci Sports, v.11, n.1, Feb, p.9-15. 2001.

KOSKINEN, S. O., W. WANG, A. M. AHTIKOSKI, M. KJAER, X. Y. HAN, J. KOMULAINEN, V. KOVANEN e T. E. TAKALA. **Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.280, n.5, May, p.R1292-300. 2001.

KUME, K., K. SATOMURA, S. NISHISHO, E. KITAOKA, K. YAMANOUCHI, S. TOBIUME e M. NAGAYAMA. **Potential role of leptin in endochondral ossification.** J Histochem Cytochem, v.50, n.2, Feb, p.159-69. 2002.

LAMBERT, E., E. DASSE, B. HAYE e E. PETITFRERE. **TIMPs as multifacial proteins.** Crit Rev Oncol Hematol, v.49, n.3, Mar, p.187-98. 2004.

LEONTOVICH, A. A., J. ZHANG, K. SHIMOKAWA, H. NAGASE e M. P. SARRAS, JR. **A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process.** Development, v.127, n.4, Feb, p.907-20. 2000.

MAAS, H., G. C. BAAN e P. A. HUIJING. **Intermuscular interaction via myofascial force transmission: effects of tibialis anterior and extensor hallucis longus length on force transmission from rat extensor digitorum longus muscle.** J Biomech, v.34, n.7, Jul, p.927-40. 2001.

MACKEY, A. L., A. E. DONNELLY, T. TURPEENNIEMI-HUJANEN e H. P. ROPER. **Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions.** J Appl Physiol, v.97, n.1, Jul, p.197-203. 2004.

MARQUETI, R. C., J. PRESTES, M. PASCHOAL, O. H. RAMOS, S. E. PEREZ, H. F. CARVALHO e H. S. SELISTRE-DE-ARAÚJO. **Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids.** Eur J Appl Physiol, v.104, n.6, Dec, p.1087-93. 2008.

MARQUETI, R. C., J. PRESTES, U. S. STOTZER, M. PASCHOAL, R. D. LEITE, S. E. PEREZ e H. S. SELISTRE DE ARAÚJO. **MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle.** Int J Sports Med, v.29, n.7, Jul, p.559-63. 2008.

MASSOVA, I., L. P. KOTRA, R. FRIDMAN e S. MOBASHERY. **Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.** Faseb J, v.12, n.12, Sep, p.1075-95. 1998.

MATRISIAN, L. M. **The matrix-degrading metalloproteinases.** Bioessays, v.14, n.7, Jul, p.455-63. 1992.

_____. **Matrix metalloproteinases.** Current Biology, v.10, n.19, p.692-692. 2000.

MCARDLE, W. D., F. I. KATCH e V. L. KATCH. **Fisiologia do Exercício - Energia, Nutrição e Desempenho Humano:** Guanabara Koogan. 2008

MCARDLE, W. D., KATCH, I.K., KATCH, V.L. **Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance:** Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 2007. 1068 p. (Exercise Physiology (MC Ardle) Series M - Medicine Series Exercise Physiology)

MOTT, J. D. e Z. WERB. **Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases.** Curr Opin Cell Biol, v.16, n.5, Oct, p.558-64. 2004.

NATHAN, C. **Neutrophils and immunity: challenges and opportunities.** Nat Rev Immunol, v.6, n.3, Mar, p.173-82. 2006.

- NELSON, A. R., B. FINGLETON, M. L. ROTHENBERG e L. M. MATRISIAN. **Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications.** J Clin Oncol, v.18, n.5, Mar, p.1135-49. 2000.
- OHTAKE, Y., H. TOJO e M. SEIKI. **Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle.** J Cell Sci, v.119, n.Pt 18, Sep 15, p.3822-32. 2006.
- PAGE-MCCAW, A., A. J. EWALD e Z. WERB. **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.** Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.3, Mar, p.221-33. 2007.
- PARKS, W. C., C. L. WILSON e Y. S. LÓPEZ-BOADO. **Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity.** Nature Reviews Immunology, v.4, n.8, p.617-629. 2004.
- PETTE, D. **Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle.** J Appl Physiol, v.90, n.3, Mar, p.1119-24. 2001.
- PETTE, D. e R. S. STARON. **Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions.** Microsc Res Tech, v.50, n.6, Sep 15, p.500-9. 2000.
- PROSKE, U. e T. J. ALLEN. **Damage to skeletal muscle from eccentric exercise.** Exerc Sport Sci Rev, v.33, n.2, Apr, p.98-104. 2005.
- RANVIER, L. **Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blanc, chez les lapins et chez les raises.** CR Hebd Acad Sci (Paris), v.77, p.1030 - 1043. 1873.
- REZNICK, A. Z., O. MENASHE, M. BAR-SHAI, R. COLEMAN e E. CARMELI. **Expression of matrix metalloproteinases, inhibitor, and acid phosphatase in muscles of immobilized hindlimbs of rats.** Muscle Nerve, v.27, n.1, Jan, p.51-9. 2003.
- ROACH, D. M., R. A. FITRIDGE, P. E. LAWS, S. H. MILLARD, A. VARELIAS e P. A. COWLED. **Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline.** Eur J Vasc Endovasc Surg, v.23, n.3, Mar, p.260-9. 2002.
- RULLMAN, E., J. NORRBOM, A. STROMBERG, D. WAGSATER, H. RUNDQVIST, T. HAAS e T. GUSTAFSSON. **Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle.** J Appl Physiol, v.106, n.3, Mar, p.804-12. 2009.

RULLMAN, E., H. RUNDQVIST, D. WAGSATER, H. FISCHER, P. ERIKSSON, C. J. SUNDBERG, E. JANSSON e T. GUSTAFSSON. **A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle.** J Appl Physiol, v.102, n.6, Jun, p.2346-51. 2007.

SCHOSER, B. G., D. BLOTTNER e H. J. STUERENBURG. **Matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies: enhanced immunoreactivity near atrophic myofibers.** Acta Neurol Scand, v.105, n.4, Apr, p.309-13. 2002.

SMITH, C., M. J. KRUGER, R. M. SMITH e K. H. MYBURGH. **The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities.** Sports Medicine, v.38, n.11, p.947-969. 2008.

SMITH, L. L., A. ANWAR, M. FRAGEN, C. RANANTO, R. JOHNSON e D. HOLBERT. **Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise.** Eur J Appl Physiol, v.82, n.1-2, May, p.61-7. 2000.

STERNLICHT, M. D. e Z. WERB. **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** Annu Rev Cell Dev Biol, v.17, p.463-516. 2001.

STEWART, C. E. e J. RITTWEGER. **Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences.** J Musculoskelet Neuronal Interact, v.6, n.1, Jan-Mar, p.73-86. 2006.

STRONGIN, A. Y., I. COLLIER, G. BANNIKOV, B. L. MARMER, G. A. GRANT e G. I. GOLDBERG. **Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.** J Biol Chem, v.270, n.10, Mar 10, p.5331-8. 1995.

TAKALA, T. E. e P. VIRTANEN. **Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading.** Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, v.10, n.6, p.321-325. 2000.

TIDBALL, J. G. **Force transmission across muscle cell membranes.** J Biomech, v.24 Suppl 1, p.43-52. 1991.

_____. **Inflammatory processes in muscle injury and repair.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.288, n.2, Feb, p.R345-53. 2005a.

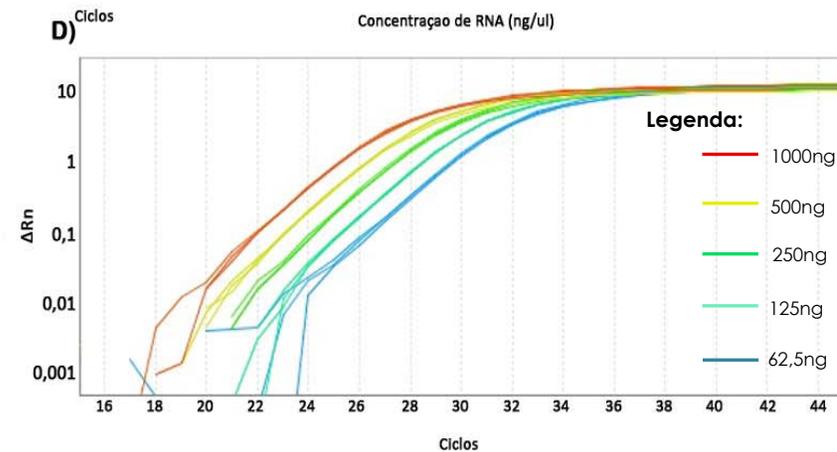
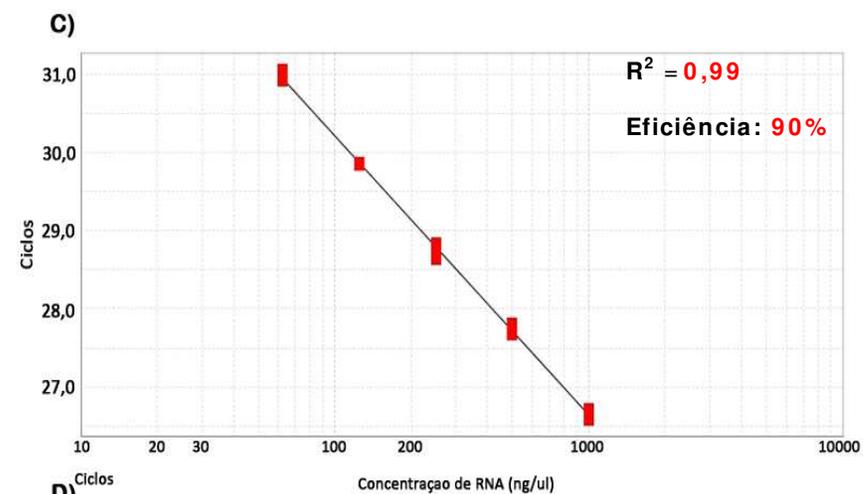
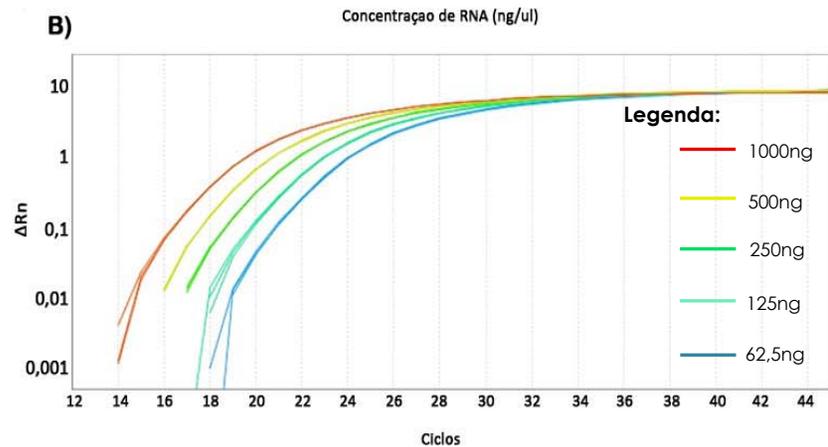
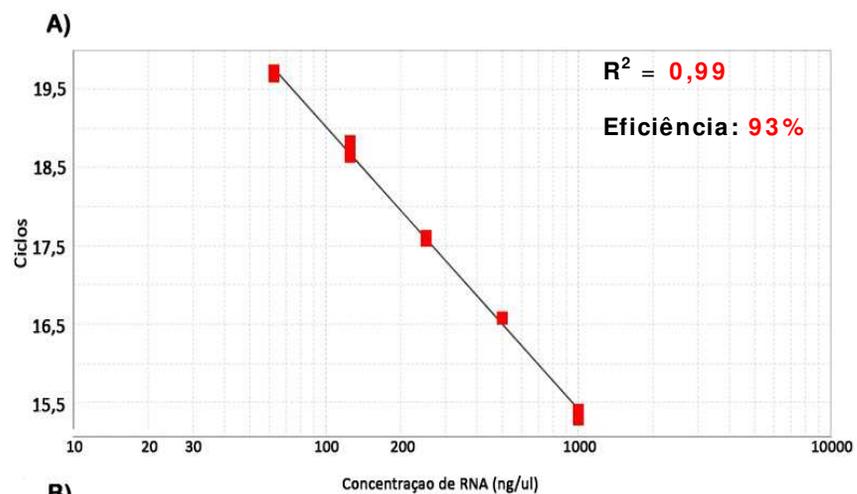
_____. **Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation.** J Appl Physiol, v.98, n.5, May, p.1900-8. 2005b.

- VAN WART, H. E. e H. BIRKEDAL-HANSEN. **The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.14, Jul, p.5578-82. 1990.
- VIERCK, J., B. O'REILLY, K. HOSSNER, J. ANTONIO, K. BYRNE, L. BUCCI e M. DODSON. **Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise.** Cell Biol Int, v.24, n.5, p.263-72. 2000.
- VIIDIK, A. **Functional properties of collagenous tissues.** Int Rev Connect Tissue Res, v.6, p.127-215. 1973.
- VISSE, R. e H. NAGASE. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** Circ Res, v.92, n.8, May 2, p.827-39. 2003.
- WARD, R. V., R. M. HEMBRY, J. J. REYNOLDS e G. MURPHY. **The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1.** Biochem J, v.278 (Pt 1), Aug 15, p.179-87. 1991.
- WARREN, G. L., C. P. INGALLS, D. A. LOWE e R. B. ARMSTRONG. **Excitation-contraction uncoupling: major role in contraction-induced muscle injury.** Exerc Sport Sci Rev, v.29, n.2, Apr, p.82-7. 2001.
- WILHELM, S. M., I. E. COLLIER, B. L. MARMER, A. Z. EISEN, G. A. GRANT e G. I. GOLDBERG. **SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages.** J Biol Chem, v.264, n.29, Oct 15, p.17213-21. 1989.
- WOESSNER, J. F. e H. NAGASE. **Matrix metalloproteinases and TIMPs.** Oxford University Press. 2000.
- YAMADA, M., Y. SANKODA, R. TATSUMI, W. MIZUNOYA, Y. IKEUCHI, K. SUNAGAWA e R. E. ALLEN. **Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner.** Int J Biochem Cell Biol, v.40, n.10, p.2183-91. 2008.
- YAN, C. e D. D. BOYD. **Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.** J Cell Physiol, v.211, n.1, Apr, p.19-26. 2007.

ZIERATH, J. R. e J. A. HAWLEY. **Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties.** PLoS Biol, v.2, n.10, Oct, p.e348. 2004.

ZIMOWSKA, M., E. BRZOSKA, M. SWIERCZYNSKA, W. STREMINSKA e J. MORACZEWSKI. **Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo.** Int J Dev Biol, v.52, n.2-3, p.307-14. 2008.

7. ANEXOS



Anexo 1 - Teste de eficiência. Curva padrão e curva de amplificação, respectivamente do controle endógeno GAPDH (A e B) e do gene alvo TIMP-2 (C e D) para uma amostra de referência.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



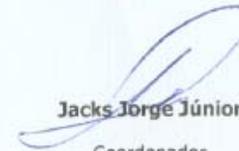
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Desenvolvimento de tecnologia esportiva através de uma ação multidisciplinar**", protocolo nº **019/2004**, dos pesquisadores **DENISE VAZ DE MACEDO, BRUNO MENEZES DE OLIVEIRA, CHARLES RICARDO LOPES, DANILO LOPES FERRUCCI, EDUARDA FARIA ABRAHÃO MACHADO, FERNANDA LORENZI LAZARIM, FERNANDO OLIVEIRA CATANHO DA SILVA, JOSÉ CAMILLO NOVELLO, LAURO TATSUO KUBOTA, LÁZARO ALESSANDRO SOARES NUNES, LUCAS SAMUEL TESSUTTI, MIRTES STANCANELLI, PAULO GUIMARÃES GANDRA, RENATO BUSCARIOLLI DE OLIVEIRA, RODRIGO HOHL e THIAGO FERNANDO LOURENÇO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 01/06/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Sportive technology development through a multidisciplinary action**", register number **019/2004**, of **DENISE VAZ DE MACEDO, BRUNO MENEZES DE OLIVEIRA, CHARLES RICARDO LOPES, DANILO LOPES FERRUCCI, EDUARDA FARIA ABRAHÃO MACHADO, FERNANDA LORENZI LAZARIM, FERNANDO OLIVEIRA CATANHO DA SILVA, JOSÉ CAMILLO NOVELLO, LAURO TATSUO KUBOTA, LÁZARO ALESSANDRO SOARES NUNES, LUCAS SAMUEL TESSUTTI, MIRTES STANCANELLI, PAULO GUIMARÃES GANDRA, RENATO BUSCARIOLLI DE OLIVEIRA, RODRIGO HOHL and THIAGO FERNANDO LOURENÇO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 01/06/2005.


Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Jacks Jorge Júnior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 2 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (Faculdade de odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas).