

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Alexandre Donizete Ferreira

**ANÁLISE FENOTÍPICA DO MÚSCULO SEMITENDINOSO DE RATOS
WISTAR E OS EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO SOBRE
SUAS FIBRAS MUSCULARES.**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ferreira, Alexandre Donizete

F413a Análise fenotípica do músculo semitendinoso de ratos wistar e os efeitos do treinamento intervalado sobre suas fibras musculares / Alexandre Donizete Ferreira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gerson Eduardo Rocha Campos
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Ratos. 2. Músculos. 3. Fibras de animais - Identificação.
4. Treinamento físico. I. Campos, Gerson Eduardo Rocha.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 17 de dezembro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos (orientador) _____

Assinatura

Prof. Dr. Joaquim Maria Ferreira Antunes Neto _____

Assinatura

Prof. Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva _____

Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel _____

Assinatura

Agradecimentos

Ao meu **avô Orlando** pela sua grande generosidade e a minha **avó Jordelina** pela sua sabedoria e presença espiritual.

Ao **Prof. Gerson**, por ter me acolhido quando ainda estava na graduação, pela sua paciência e apoio. Obrigado por me conceder a oportunidade de ser um ser humano melhor.

À **Prof^a. Valéria Cagnon Quitete**, por ser sempre atenciosa e solícita, pelas oportunidades de me ver também como um educador durante o estágio docente.

À **Prof^a. Maria Júlia Marques**, por sua capacidade de ser simples e clara ao ensinar, pela sua cordialidade e atenção.

Ao **Prof^o. Humberto Santo Neto**, por ser um poeta da anatomia. Obrigado por ter tido oportunidade de acompanhá-lo durante as aulas do estágio docente.

Ao **Prof^o. Alexandre L. R. de Oliveira**, por sua solicitude e considerações no meu exame de qualificação.

Ao **Prof^o. Edison Duarte**, um gênio da teoria e prática. Obrigado por ter tido aulas com o senhor na graduação e por sua presença no meu exame de qualificação.

À **Prof^a. Elaine Minatel**, sempre educada e atenciosa. Obrigado pela presença e considerações no meu exame de qualificação.

À todos os **outros professores** do Departamento de Anatomia, pela a oportunidade de conviver com vocês e aprender mais.

À **Prof^a. Vilma Nista**, uma mulher admirável pela sua capacidade de ações e generosidade. Obrigado por ter me acolhido e confiado em mim.

À **Profª. Silvana Venâncio**, mulher forte e generosa. Obrigado por deixar eu partilhar de seu caminho. Aprendi muito.

À minha família “campineira” (**Mário, Netho, Paulo Castilho, Paulo Granja e Zeca**), filhos de pais diferentes, porém irmãos pelo conhecimento, generosidade e companheirismo. **Netho** obrigado pela direção que você fez minha vida tomar. Vocês são muito importantes.

Ao **Mark** pela generosidade e paciência.

A todos **os colegas do Departamento de Anatomia**, pela convivência e amizade. Em especial **Viviane e Eduardo Cândido**, pessoas maravilhosas, espero que possamos nos encontrar sempre.

Às **Sras. Lílian Alves e Ana Floriano**, pela atenção e carinho prestados durante todo o trabalho.

Ao **Carlos**, pela amizade, ajuda, conversas e risadas. Sou muito grato.

Ao **Marquinhos**, pelo carinho e atenção com que sempre me tratou. Obrigado sempre.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, **Sra Marlene Lima, Srs. Paulo Afonso, Paulo Francisco, Enori e Toni**, pela atenção e também competência com que executam seus trabalhos.

A **todos aqueles** que ajudaram de forma direta e indireta a estabelecer essa teia humana.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro concedido para a realização desse projeto.

Obrigado.

Dedicatória

À Deus,

por sua presença constante em minha vida.

À minha Mãe,

mulher forte e agraciada por Deus. Obrigado por ter me dado a oportunidade para eu chegar onde estou, devo e dedico isso a senhora.

À minha Irmã,

pela amizade, antes de tudo. Você e a mãe são as pessoas por quem faço tudo, amo vocês.

Lista de Abreviações

DP – desvio padrão

GC – grupo controle

GT – grupo treinado

I – fibra pura do tipo I

IC – fibra híbrida do tipo IC

IIA – fibra pura do tipo IIA

IIAD – fibra híbrida do tipo IIAD

IIB – fibra pura do tipo IIB

IID/X – fibra pura do tipo IID/X

IIDB -fibra híbrida do tipo IIDB

MHC – myosin heavy chain

MHCI – isoforma de miosina do tipo I

MHCIIa – isoforma de miosina do tipo IIa

MHCIIb – isoforma de miosina do tipo IIb

MHCIIId/x – isoforma de miosina do tipo IId/x

MLC – myosin light chain

RNA_m – RNA mensageiro

SEM – músculo semitendinoso

SOL – músculo sóleo

Lista de Ilustrações

Introdução Geral

Figura 1 Compartimentalização da musculatura estriada esquelética, desde a sua estrutura macroscópica até a localização dos miofilamentos dentro dos sarcômeros. 14

Figura 2 Miofilamento de miosina mostrando a região da MHC e a sua relação na expressão dos tipos de fibras musculares. 15

Artigo

Figura 1 Reação histoquímica de mATPase de secções transversais do músculo semitendinoso de ratos Wistar. 38

Figura 2 Separação eletroforética ampliada das isoformas de miosina (MHC) do músculo semitendinoso de Wistar. 40

Figura 3 Separação eletroforética das isoformas de miosinas (MHC) do músculo semitendinoso de ratos Wistar do Grupo Treinado e Grupo Controle. 41

Figura 4 Número de fibras do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle. 42

Figura 5 Número de fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle. 43

Figura 6 Número de fibras da porção branca do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle. 44

Anexos

Figura 1' Ilustração gráfica dos tipos de fibras musculares esqueléticas de ratos para a técnica histoquímica de mATPase após pré-incubações nos pHs 4.3, 4.5, 10.5 (Staron et al., 1999). 59

Lista de Tabelas

Artigo

Tabela 1 Protocolo de treinamento intervalado.	37
Tabela 2 Porcentagem dos tipos de fibras musculares no músculo semitendinoso de ratos Wistar do Grupo Controle.	39
Tabela 3 Área de secção transversal das fibras do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle.	45
Tabela 4 Área de secção transversal das fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle.	46
Tabela 5 Área de secção transversal das fibras da porção branca do músculo semitendinoso dos animais do Grupo Treinado e Grupo Controle.	47
Tabela 6 Porcentagem relativa das isoformas de miosina (MHC) no músculo semitendinoso de ratos Wistar.	48
Anexos	
Tabela 1' Protocolo de período de adaptação.	60
Tabela 2' Protocolo de treinamento intervalado.	61
Tabela 3' Número de fibras do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	62
Tabela 4' Número de fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	63
Tabela 5' Número de fibras da porção branca do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	64
Tabela 6' Área de secção transversal das fibras do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	65
Tabela 7' Área de secção transversal das fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	66
Tabela 8' Área de secção transversal das fibras da porção branca do músculo semitendinoso de cada animal do Grupo Controle e Grupo Treinado.	67

RESUMO

Os músculos esqueléticos em geral são constituídos por vários tipos de fibras que expressam diferentes isoformas de miosina (MHC). As miosinas dos tipos I, IIa, IId/x e IIb estão presentes nas fibras puras dos tipos I, IIA, IID/X e IIB, respectivamente. Entre as fibras puras existem as fibras híbridas, que podem expressar duas ou mais isoformas de miosina. Nesse trabalho foi verificado, através da técnica histoquímica de mATPase e da técnica de separação eletroforética de proteínas, os tipos de fibras que compõe o músculo semitendinoso de ratos Wistar e as respectivas isoformas de miosina. Também foi avaliado como o treinamento intervalado pode influenciar na plasticidade dessas fibras. Os resultados mostraram que o músculo semitendinoso possui duas porções distintas, uma vermelha e outra branca. Apresenta todos os tipos de fibras puras, com predominância das fibras do tipo IIB, caracterizando-o como um músculo de contração rápida. Observou-se também a presença de fibras híbridas dos tipos IC, IIC, IIAD e IIDB. O treinamento promoveu alterações nas fibras musculares, em especial nas fibras do grupo II. Em conclusão, o fenótipo do músculo semitendinoso é de contração rápida e o treinamento intervalado foi capaz de promover aumento do número de fibras híbridas IC, IIAD e IIDB, bem como, aumento da secção transversal das fibras IIDB e IIB.

ABSTRACT

In general, the skeletal muscles are formed to several muscle fiber types that are able to express different kinds of myosin heavy chain (MHC) isoforms. The MHCI, IIa, IId and IIb will establish the pure muscle fibers of the type I, IIA, IID and IIB, respectively and, among them there are the hybrid fibers that can express two or more MHC types. In this work was verified through mATPase histochemical and eletophoretic separation techniques which myosin isoforms and hybrids make the semitendinous muscle of the Wistar rats and also how intermittent training influence in the plasticity of these fibers. It was seen that this muscle has two distinct portions, one red portion and one white portion and that was meeting all pure fibers, where the IIB type was seen in large number, characterized the semitendinous how muscle of fast twitch. There was also observed the presence of the IC, IIC, IIAD, IIDB hybrid fibers. The training promoted changes in the muscle fibers, in special in the hybrid fibers of the group II and promoted increase in the cross-sectional area of some glycolytic fibers (IIDB and IIB). In conclusion, the phenotype of the semitendinous muscle is formed in great part by fast-twitch fibers and the training was able to promote changes in the MHC isoforms present in these muscle fibers.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	13
Tecido muscular	13
Treinamento físico	17
MATERIAIS E MÉTODOS	19
REFERÊNCIAS	23
ARTIGO	28
ANEXOS	58

INTRODUÇÃO GERAL

Tecido muscular:

O tecido muscular apresenta três variedades de músculos: liso, estriado cardíaco e estriado esquelético. O primeiro caracteriza-se por possuir células mononucleadas, contração involuntária e está presente nas vísceras, tal como na parede do trato digestório, desde a porção média do esôfago até o esfíncter interno do ânus. Nesses locais ele fornece força motriz e propulsora para que o alimento percorra todo o trajeto, passando pelas porções absorptiva e excretora do sistema digestório. É encontrado também nas vias respiratórias, nas paredes dos vasos sanguíneos e em outras vísceras. O músculo estriado cardíaco, presente no coração e início dos grandes vasos, apresenta estriações transversais ao longo de suas fibras devido ao arranjo de suas proteínas contráteis e é dotado de contração involuntária. Já a musculatura estriada esquelética é responsável pelos movimentos do corpo, os quais são realizados através de um sistema de alavancas que permite o deslocamento de um segmento em relação a outro. Suas células possuem a capacidade de contrair-se voluntariamente, apresentam-se multinucleadas, alongadas e são chamadas de fibras musculares. Estas, por sua vez, são formadas por miofibrilas, compostas de unidades funcionais, os sarcômeros (GUYTON; HALL, 1996; McARDLE, 1998). As miofibrilas são formadas por dois conjuntos protéicos, chamados de miofilamentos que vão se diferir em dimensões e composições químicas (ROME, 1997), onde, um conjunto é formado pelo complexo troponina, tropomiosina e actina, chamado de filamento fino, e outro pela miosina, filamento grosso (Fig.1).

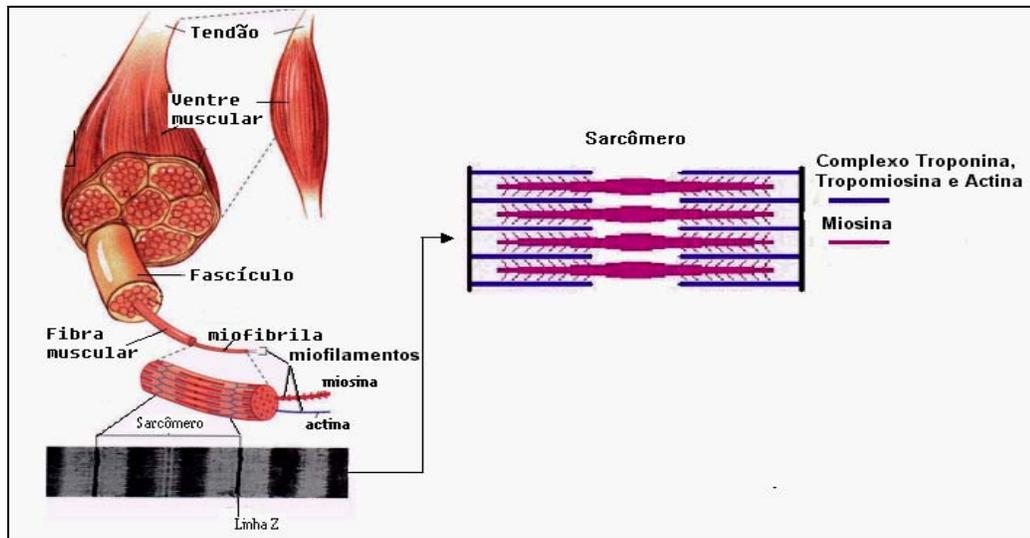


Figura 1: Compartimentalização da musculatura estriada esquelética, desde a sua estrutura macroscópica até a localização dos miofilamentos dentro dos sarcômeros. Adaptada da página www.fig.cox.miami.edu.

A miosina, por sua vez, pode ser clivada em dois fragmentos, a miosina de cadeia leve (myosin light chain, MLC) que constitui o eixo da molécula e a miosina de cadeia pesada (myosin heavy chain, MHC), compreendendo o segmento mais curto, globular e dotado de atividade ATPásica (VEMURI et al., 1999; WAHRMANN et al., 2001). A MHC é a estrutura protéica que entrará em contato com o sítio ativo da actina através da degradação de moléculas de ATP, permitindo o deslizamento da actina sobre a miosina e conseqüente encurtamento das fibras musculares, culminado na contração (TALMADGE; ROY, 1993; BIGARD et al., 1996). As miosinas de cadeia pesada são formadas por isoformas de proteínas que vão hidrolisar o ATP em velocidades diferentes, permitindo que as fibras possam ser classificadas em dois grupos, um de contração lenta e outro de contração rápida (Fig. 2).

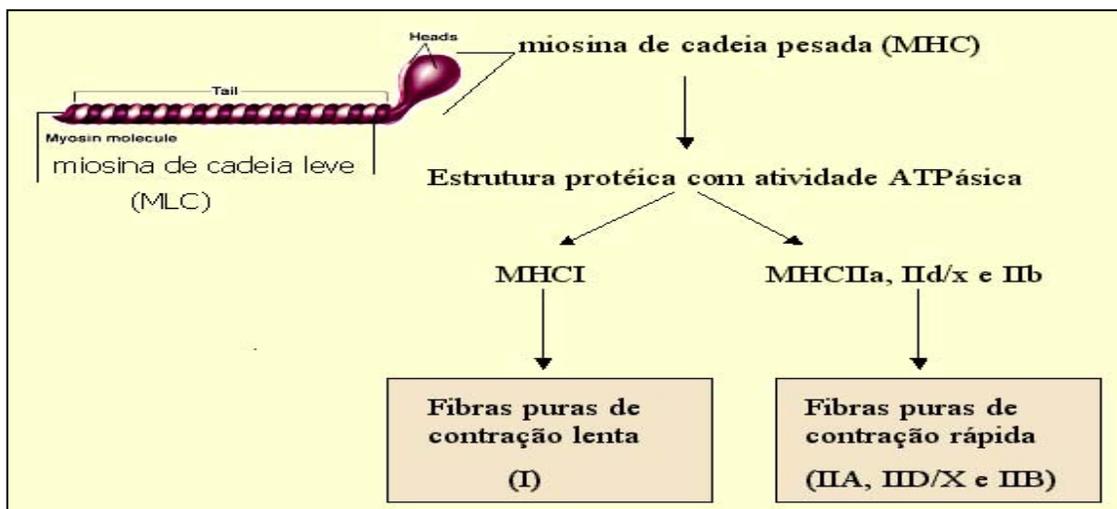


Figura 2: Miofilamento de miosina mostrando a região da MHC e a sua relação na expressão dos tipos de fibras musculares. Miofilamento de miosina adaptado da página www.bmb.psu.edu.

As fibras de contração lenta expressam MHCI, enquanto as MHCIIa, IId/x e IIb estão presentes nas fibras de contração rápida (SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994; PETTE; STARON, 1997; STARON et al., 1999). Em roedores encontram-se as isoformas de miosina I, IIa, IId/x e IIb, já em humanos são encontradas as miosinas I, IIa e IIb. Atualmente, as isoformas IIb de humanos tendem a ser classificadas como IId/x, pelo fato, dessas apresentarem velocidade de contração semelhante à dos roedores (BOTTINELLI; REGGIANI, 2000; PARCEL et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2001). E também, alguns pesquisadores têm identificado a presença do gene MHCIIb no genoma humano, no entanto a evidência da expressão dessa proteína na prática não tem sido significativa (GOLDSPINK, 2003; WEISS et al., 1999; WEISS et al., 1999). As fibras que expressam essas isoformas são ditas puras do tipo I, IIA, IID/X e IIB.

Entre as fibras puras, encontram-se aquelas que são formadas por duas ou mais isoformas de miosina em proporções diferentes (IC = MHCI > MHCIIa, IIC = MHCIIa = MHCI, IIAC = MHCIIa > MHCI, IIAD = MHCIIa > MHCIIId, IIDB = MHCIIId > MHCIIb),

sendo classificadas como fibras híbridas (DI MASO et al., 2000; PETTE; STARON, 2000). Assim, pode-se delinear no mínimo 10 tipos diferentes de fibras musculares em ratos: I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAD, IIDA, IID, IIDB e IIB (PETTE; STARON, 2000), e em humanos é possível obter 7 tipos: I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAB, IIB (FRY, 2004; PETTE; STARON, 2000).

Essa diversidade de fibras torna os músculos estriados esqueléticos capazes de responder a diversos estímulos, levando a alterações moleculares que têm início no interior da célula, através da expressão de genes específicos que regulam a produção dos diferentes tipos de miosina (GOLDSPINK, 2003). Esses genes permitirão, por sua vez, a transcrição de novas moléculas de RNAm e conseqüente tradução de proteínas específicas (WILLOUGHBY; PELSUE, 2000), indo culminar na expressão do fenótipo adaptado. Os estímulos podem tanto ter um caráter endógeno quanto exógeno. Entre os estímulos endógenos pode-se citar alterações na atividade neuromuscular, alterações nos níveis hormonais e idade. Nos exógenos encontram-se aqueles fatores que agem sobre o organismo através de influências externas: estimulação elétrica, carga mecânica, ausência de carga, microgravidade e exercício físico (ROY et al., 1997; JAKUBIEC-PUKA et al., 1999; MANNION, 1999).

Um dos fatores externos de grande importância na alteração do comportamento das fibras musculares é o exercício físico (GOLDSPINK, 1998; WILLIAMSON et al., 2000; PETTE, STARON, 2001; WILLIAMSON et al., 2001; PARCELL et al., 2003), que permitirá transição das fibras tanto no sentido de lento para rápido (I=>IIA=>IID=>IIB) quanto de rápido para lento (IIB=>IID=>IIA=>I), sendo que essa mudança não se dá

sempre para os extremos, mas para aquelas fibras que melhor respondem metabolicamente ao estímulo aplicado.

Essas transições se dão através da modulação da intensidade e duração do treinamento (BOMPA; CORNACCHIA, 1998; ANDERSEN et al., 2000). A aplicação de um treinamento físico de baixa intensidade e longa duração pode induzir uma conversão de fibras rápidas em fibras lentas, por outro lado, um treinamento de alta intensidade e curta duração pode causar um resultado oposto, isto é, conversão de fibras lentas para rápidas (CAIOZZO et al., 2000; CAMPOS et al., 2002).

Treinamento físico

O treinamento físico é a soma de todos os estímulos realizados em um determinado espaço de tempo, levando o organismo a modificações funcionais e morfológicas (BARBANTI, 1979). A sistematização de exercícios é estabelecida de acordo com a especificidade da modalidade a ser trabalhada e é dividida em fases ou ciclos, tendo como objetivo a quebra da homeostase intracelular inicial, em que, as células, os tecidos, os órgãos e conseqüentemente o indivíduo passam por um processo adaptativo, em que, irá restabelecer uma nova homeostase com níveis energéticos maiores do que os níveis anteriores. Essas alterações metabólicas continuam inclusive nas fases de regeneração/repouso, resultando em uma supercompensação de substratos energéticos e enzimáticos que serão utilizados em exercícios que necessitem maior mobilização energética ou, então, minimizando os processos de quebras homeostáticas do treinamento já estabelecido (FRY et al., 1992).

Há uma fase que antecede o treinamento propriamente dito, realizada em uma intensidade baixa, tendo como objetivo uma preparação das estruturas articulares e tendões,

na tentativa de diminuir possíveis lesões nesses locais, já que a adaptação do ventre muscular é superior à dessas estruturas.

Os ciclos podem ser montados de acordo com o princípio da carga contínua (treinamento contínuo), predominante em atividades de longa duração (metabolismo aeróbio), com maior volume e intensidades menores. Ou da carga periódica, tendo como princípio norteador menor duração e maior intensidade (metabolismo anaeróbio) (WEINECK, 2000), características que podem ser trabalhadas no treinamento intervalado.

Dessa forma, devido à alta intensidade aplicada durante o exercício, o treinamento intervalado é realizado de maneira descontínua, onde o trabalho é interrompido por intervalos regulares para depois ser novamente aplicado (VOLKOV, 2002). Ele pode ser classificado de acordo com a intensidade do estímulo em extensivo e intensivo, e também de acordo com o volume em curto, médio e longo. Segundo Weineck (1999; 2000), o método intervalado extensivo caracteriza-se por uma grande abrangência e intensidade relativamente pequena; já o intensivo possui uma pequena abrangência e grande intensidade. O treinamento intervalado de curta duração compreende um tempo de realização de trabalho de 15 a 60 segundos, o de duração média preconiza um tempo de 1 a 8 minutos e o de longa duração um tempo de 8 a 15 minutos.

Dessa forma, no treinamento intervalado o momento do exercício e o período de repouso ou pausa representam etapas importantes para a obtenção do efeito almejado. Segundo Volkov (2002) a eficácia do treinamento intervalado, sobretudo, depende também dos períodos de repouso. Ou seja, tanto no momento da execução do exercício quanto nos intervalos, o organismo está respondendo ao estímulo aplicado. O que vale ressaltar que durante a prática do exercício, o indivíduo pode estar realizando um trabalho anaeróbio,

porém durante a fase de repouso há uma grande entrada de oxigênio no sistema orgânico, induzindo respostas enzimáticas através da via aeróbia, fazendo com que as fibras musculares tornem-se mais eficientes diante do agente estressor (treinamento físico).

O protocolo de treinamento utilizado nesta pesquisa foi desenvolvido pelo Laboratório de Bioquímica do Exercício da Unicamp (Labex) inicialmente, para análise do potencial de estresse oxidativo induzido pelo exercício intervalado e posterior análise das proteínas de estresse no músculo e no sangue, sendo classificado como intensivo e de curta duração, com um tempo de trabalho médio de 2,5 minutos (SMOLKA et al., 2000). Dentro dos princípios de treinamento preconizados por Weineck (1999; 2000), este protocolo seria classificado como de duração média. Assim sendo, esse estudo se propôs a analisar os tipos de fibras do músculo semitendinoso de ratos Wistar machos e demonstrar o comportamento das fibras após a aplicação de um treinamento intervalado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade no início do estudo, obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Foram formados dois grupos com oito animais, um grupo controle (GC) e um grupo treinado (GT). Durante o período de treinamento os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (18° a 22°C), foto período de 12 horas e providos de ração e água *ad libitum*.

Protocolo de treinamento

O GC não foi submetido a nenhum tipo de exercício. O GT passou por uma adaptação específica durante uma semana. Nesse período, o tempo de corrida foi fixado em 10

minutos por dia e a velocidade inicial foi de 10 m/min com o aumento de 5 m/min a cada dois dias. O tempo de corrida foi dividido em três “sprints” de 2 minutos com pausa de 2 minutos (Anexos, Tab. 1’). Após esta fase, o GT entrou no treinamento propriamente dito, isto é, 6 dias/semana durante 8 semanas. A velocidade inicial foi de 20 m/min com 4 repetições de 5 min. e intervalo de 2 min. Na segunda semana a velocidade foi de 30 m/min com 4 repetições de 2,5 min. e intervalo de 1 min. Na terceira semana a velocidade foi de 32,5 m/min com 6 repetições de 2,5 min. e intervalo de 1 min. Da quarta até a oitava semana a velocidade foi de 35 m/min. com 6 repetições de 2,5 min. e intervalo de 1 min (Anexos, Tab. 2’).

Preparação das amostras

Imediatamente após o período de treinamento, os animais foram sacrificados com superdosagem de Ketamina e Cloridrato de Xylasina (1:1) e em seguida, tiveram o músculo semitendinoso retirado, congelado em isopentano e resfriado em nitrogênio líquido à temperatura de -176°C. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer -80°C. Após esse período, os músculos foram levados para um criostato a -24°C onde se obteve cortes transversais de 12µm de espessura do seu ponto médio.

Análise histoquímica e morfométrica das fibras

Os cortes foram submetidos à reação de mATPase (myofibrillar adenosine triphosphatase) (PETTE; STARON, 1993) após pré-incubações em pH de 4.3, 4.5 (BROOKE; KAISER, 1970) e 10.5 (GUTH; SAMAHA, 1970). Os pHs foram ajustados em função da especificidade existente entre músculos de animais da mesma espécie. Foram feitas fotomontagens dos cortes no pH 4.5 que, em conjunto com a observação dos cortes

nos pHs 4.3 e 10.5 (Anexos, Fig. 1'), pode-se caracterizar e determinar o número de cada tipo de fibra existente no músculo. A área de secção transversal de pelo menos cinquenta fibras de cada tipo (I-IIA-IID/X-IIB) por animal foi obtida através do programa Image ProExpress.

Análise bioquímica e densitométrica das isoformas de miosina

Após a coleta para histoquímica obteve-se 8 cortes para análise bioquímica que foram imediatamente colocados em 0,5ml do seguinte meio: 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) 2 mercaptoethanol e 2,3% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) em 62,5 mM Tris/HCL buffer (pH 6,8). O meio foi agitado durante um minuto e aquecido por 10 minutos a 60°C. Pequenas porções do extrato (7 µl) foram submetidas à eletroforese em gel (gradiente de 7-10%) de poliacrilamina (SDS) com 17-18 horas de corrida a 120V. Foi incluída também uma amostra do músculo sóleo como controle, por apresentar em ratos, cerca de 95% de MHCI e 5% de MHCII (STARON et al., 1999). Os géis foram corados com Coomassie Blue (BÄR; PETTE, 1988) ou prata (BLUM et al., 1987). As cadeias de miosina foram identificadas de acordo com sua aparente massa molecular, comparadas com marcadores de proteínas. As isoformas de miosina foram analisadas em um densitômetro Sharp – Macintosh Scanning Utilities pelo programa Labscan, capturando a imagem do gel e transferindo-o para o programa ImageMaster. Obteve-se, então, a porcentagem relativa das isoformas de miosinas I, IIa, IID/x e IIB.

Análise estatística

Os resultados foram analisados e expressos através de suas médias e desvio padrão. Significância estatística das diferenças entre as médias de ambos os grupos foram

calculadas pelo teste t de Student e Mann Whitney para amostras independentes, através do programa Instat. Significância para $p < 0.05$ foi considerada significativa.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, J. L.; SCHJERLING, P.; SALTIN, B. Muscle, genes, and athletic performance. Sci Am, v. 283, p. 48-55. 2000.

BÄR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. FEBS Lett, v. 235, p. 153-155. 1988.

BARBANTI, V. J. Teoria e prática do treinamento desportivo. Editora Edgard Blücher LTDA. 1979. Cap. 2, p. 4-40.

BIGARD, X. A.; JANMOT, C.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; GUEZENNEC, Y.; D'ALBIS, A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. J Appl Physiol, v. 81, n. 6, p. 2658-2665. 1996.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, v. 8, n. 2, p. 93-99. 1987.

BOMPA, T.; CORNACCHIA L. Serious strenght training. Editora Human Kinetics. 1998.

BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. Prog Biophys Mol Bio, v. 73, p. 195-262. 2000.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. J Histochem Cytochem, v. 18, p. 670-672. 1970.

CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F.; BAKER, M.; McCUE, S.; BALDWIN, K. M. MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. Am J Physiol Cell Physiol, v. 278, p. C709-C717. 2000.

CAMPOS, G. E. R.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F.; RAGG, K. E.; RATAMESS, N. A.; KRAEMER, W. J.; STARON R. S.

Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. Eur J Appl Physiol, v. 88, p. 50-60. 2002.

DI MASO, N. A.; CAIOZZO, V. J.; BALDWIN, K. M. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol, v. 278, p. R1099-R1106. 2000.

FRY, A. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. Sports Med, v. 34 (10), p. 663-679. 2004.

FRY, A. C.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodisation of training stress – a review. Can J Sport Sci, v. 17, n 3, p. 234-240. 1992.

GOLDSPINK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. Comp Biochem Physiol, v. 120, part b, p. 5-15. 1998.

GOLDSPINK, G. Gene expression in muscle in response to exercise. J Muscle Res Cell M, v. 24, p. 121-126. 2003.

GUTH, L.; SAMAHA, F. J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. Exp Neurol, v. 28, p. 365-367. 1970.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Textbook of medical physiology. 9^a ed. Editora Philadelphia: W. B. Saunders. 1996.

JAKUBIEC-PUKA, A.; CIECHOMSKA, I.; MORGA, J.; MATUSIAK, A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. Comp Biochem Physiol, v. B 122, p. 355-362. 1999.

MANNION, A. F. Fibre type characteristics and function of the human paraspinal muscles: normal values and changes in association with low back pain. J Electromyogr Kines, v. 9, p. 363-377. 1999.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 4ª ed. Editora Guanabara Koogan. 1998. Cap. 18, p. 299-319.

PARCELL, A. C.; SAWYER, R. D.; POOLE, R. C. Single muscle fiber myosin heavy chain distribution in elite female track athletes. Med Sci Sports Exerc, v. 35, n 3, p. 434-438. 2003.

PETTE, D.; STARON, R. S. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based types in rat skeletal muscle. Histochemistry, v. 100, p. 149-153. 1993.

PETTE, D.; STARON, R. S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. Int Rev Cytol, v. 170, p. 143-223. 1997.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc Res Tech, v. 50, p. 500-509. 2000.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. Histochem Cell Biol, v. 115, p. 359-372. 2001.

ROME, L. C. Testing a muscle's design. American Scientist, v. 85, p. 356-363. 1997.

ROY, R. R.; TALMADGE, R. J.; FOX, K.; LEE, M.; ISHIHARA, A.; EDGERTON, V. R. Modulation of MHC isoforms in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. J Appl Physiol, v. 83, p. 280-290. 1997.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. J Appl Physiol, v. 77, n. 2, p. 493-501. 1994.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVEZ, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; SILVA, L. P.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, v. 279, p. R1539-R1545. 2000.

STARON, R. S.; KRAEMER, W. J.; HIKIDA, R. S.; FRY, A. C.; MURRAY, J. D.; CAMPOS, G. E. R. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. Histochem Cell Biol, v. 111, p. 117-123. 1999.

TALMADGE, R. J.; ROY, R. R. Eletrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. J Appl Physiol, v. 75, n. 5, p. 2337-2340. 1993.

VEMURI, R.; LANKFORD, E. B.; POETTER, K.; HASSANZADEH, S.; TAKEDA, K.; YU, Z. X.; FERRANS, V.; EPSTEIN, N. D. The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. Proc Natl Acad Sci USA, v. 96, p. 1048-1053. 1999.

VOLKOV, N. I. Teoria e prática do treinamento intervalado no esporte. 1ª ed. Editora Multiesportes. 2002.

WAHRMANN, J. P.; WINAND, R.; RIEU M. Plasticity of skeletal myosin in endurance-trained rats (I). A quantitative study. Eur J Appl Physiol, v. 84, p. 367-372. 2001.

WEINECK, J. Treinamento ideal. 9ª ed. Editora Manole Ltda, 1999.

WEINECK, J. Biologia do esporte. Edição Brasileira. Editora Manole Ltda, 2000. Parte IV, p. 155-180.

WEISS A.; MCDONOUGH D.; WERTMAN B.; ACAKPO-SATCHIVI L.; MONTGOMERY K.; KUCHERLAPATI R.; LEINWAND L.; KRAUTER K. Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. Proc Natl Acad Sci USA, v. 96, p. 2958-2963. 1999.

WEISS A.; SCHIAFFINO S.; LEINWAND L. A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. J Mol Biol, v. 290, p. 61-75. 1999.

WILLIAMSON, D. L.; GODARD, M. P.; PORTER, D. A.; COSTILL, D. L.; TRAPPE, S. W. Progressive resistance training reduces myosin heavy chain co-expression in single muscle fibers from older men. J Appl Physiol, v. 88, p. 627-633. 2000.

WILLIAMSON, D. L.; GALLAGHER, P. M.; CARROLL, C. C.; RAUR, U.; TRAPPE, S. W. Reduction in hybrid single muscle fiber proportions with resistance training in humans. J Appl Physiol, v. 91, p. 1955-1961. 2001.

WILLOUGHBY, D. S.; PELSUE, S. Effects of high-intensity strength training on steady-state myosin heavy chain isoform mRNA expression. JEPonline, v. 3, n. 4, p. 13-25. 2000.

ARTIGO (a ser submetido)

Análise fenotípica do músculo semitendinoso de ratos wistar e os efeitos do treinamento intervalado sobre suas fibras musculares. (*)

(*) O artigo será submetido à revista Histochemistry and Cell Biology, portando se encontra formatado de acordo com as normas da revista.

Análise fenotípica do músculo semitendinoso de ratos wistar e os efeitos do treinamento intervalado sobre suas fibras musculares.

Alexandre Donizete Ferreira¹. Adalberto José Crocci². Gerson Eduardo Rocha Campos¹

¹ Departamento de Anatomia – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

² Departamento de Bioestatística – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo – UNESP.

Endereço para correspondência:

Departamento de Anatomia
Instituto de Biologia – UNICAMP
Av. Bertrand Russell, s/nº. Caixa Posta 6109.
CEP: 13083-865.
Campinas, São Paulo, Brasil.
E-mail: alefef@yahoo.com.br
Tel: 19 – 3788 6101 / 3788 6102
Fax: 19 –3289 3124 (aos cuidados do Departamento de Anatomia – Instituto de Biologia, Unicamp)

RESUMO

Os músculos esqueléticos respondem a diversos estímulos alterando seu fenótipo. A capacidade de adaptação das fibras musculares está relacionada com a presença de diversas isoformas de miosina (MHC). Estas isoformas expressam quatro tipos de fibras puras: I, IIA, IID e IIB contendo MHCI, IIa, IId e IIb, respectivamente. Entre as fibras puras existem as fibras híbridas que podem expressar dois ou mais tipos de miosinas. Nesse trabalho foi verificado, através da técnica histoquímica de mATPase e da separação eletroforética de proteínas, os tipos de fibras que compõem o músculo semitendinoso de ratos Wistar machos e suas isoformas de miosina, bem como a influência do treinamento intervalado sobre a plasticidade dessas fibras. Constatou-se a presença de todos os tipos de fibras musculares puras e híbridas. As fibras do tipo IIB foram as predominantes (62.39%), caracterizando o músculo como de contração rápida. O treinamento promoveu aumento das fibras do tipo IC, IIAD e IIDB. Também houve aumento da secção transversal das fibras do tipo IIDB e IIB. Em conclusão, o músculo semitendinoso possui um fenótipo formado essencialmente por fibras de contração rápida e o treinamento foi capaz de demonstrar uma tendência de diminuição das fibras do tipo I e IIB.

Palavras-chaves: Rato Wistar, Músculo Semitendinoso, Tipos de Fibras, Treinamento Intervalado, Plasticidade Muscular.

INTRODUÇÃO

A existência de diferentes isoformas de miosina (MHC) oferece às fibras musculares esqueléticas a capacidade de se adaptarem a diversos estímulos. Estas adaptações ocorrem através da alteração de genes que expressarão o novo padrão de fibras musculares, contribuindo, dessa forma, para um fenótipo muscular heterogêneo (Demirel et al., 1999).

Nos músculos esqueléticos de animais adultos, podem existir quatro isoformas de miosina. A MHCI, que vai expressar as fibras de contração lenta do tipo I, e a MHCIIa, MHCIId e MHCIIb, presentes nas fibras de contração rápida dos tipos IIA, IID e IIB, respectivamente (Suwa et al., 2003). Entre as fibras puras encontram-se as fibras híbridas, que podem expressar dois ou mais tipos de miosina (Tajsharghi et al., 2004). Dessa maneira, estímulos específicos aplicados sobre os músculos podem fazer com que ocorra transição dessas fibras, tanto no sentido de I para IIB (I=>IIA=>IID=>IIB) quanto de IIB para I (IIB=>IID=>IIA=>I), passando sempre pelas híbridas, alterando dessa forma o seu fenótipo.

O exercício físico tem sido um dos fatores específicos de transformação das fibras musculares (Andersen et al., 2000; Pette and Staron, 2001). Por exemplo, um treinamento físico de baixa intensidade e longa duração pode induzir uma conversão de fibras do tipo IIB para I, isto é, de rápidas para lentas. Por outro lado, um treinamento de alta intensidade e curta duração pode causar uma transição no sentido oposto, isto é, de lentas para rápidas (Caiozzo et al., 2000; Campos et al., 2002).

Esse estudo se propôs a analisar os tipos de fibras que compõem o fenótipo do músculo semitendinoso de ratos Wistar machos e suas isoformas de miosina e, também, demonstrar

o comportamento dessas fibras musculares quando submetidas ao treinamento intervalado (Smolka et al., 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade no início do estudo. Foram formados dois grupos com oito animais, um grupo controle (GC) e um grupo treinado (GT). Durante o experimento os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (18 a 22°C), foto período de 12 horas e providos de ração e água *ad libitum*.

Protocolo de treinamento

Os animais foram treinados em uma esteira motorizada durante 6 dias/semana por um período de 8 semanas (Tab. 1). Antes das sessões de treinamento os animais eram submetidos a um aquecimento de 3 min a 5m/min. Os animais do GC não executaram nenhum tipo de exercício.

Preparação das amostras

Imediatamente após o período de treinamento, os animais foram sacrificados com uma superdosagem de Ketamina e Cloridrato de Xylasina (1:1). Após este procedimento o músculo semitendinoso foi retirado e congelado em isopentano resfriado em nitrogênio líquido a -176°C e armazenado em freezer a -80°C. Posteriormente, foram obtidos cortes transversais de 12 µm de espessura das amostras em um criostato a -24°C.

Análise histoquímica e morfométrica

Os cortes foram submetidos à reação de mATPase (myofibrillar adenosine triphosphatase) (Pette and Staron, 1993) após pré-incubações em pH de 4.3, 4.5 (Brooke and Kaiser, 1970) e 10.3 (Guth and Samaha, 1970). A seguir, foi feita uma foto montagem da reação em pH 4.5 onde, juntamente com a observação das reações nos pHs 4.3 e 10.3, foram identificados e contados os tipos de fibras. A área de secção transversal de aproximadamente cinquenta fibras de cada tipo (I-IIA-IIID-IIB) por animal foi mensurada através do programa Image ProExpress.

Análise bioquímica

Foram coletados 8 cortes de cada amostra para análise bioquímica. Estes foram colocados em 0,5ml do seguinte meio: 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) 2 mercaptoethanol e 2,3% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) em 62,5 mM Tris/HCL buffer (pH 6,8). Os cortes foram agitados durante um minuto e aquecido por 10 minutos a 60°C. Porções do extrato (7 µl) foram submetidos à eletroforese em gel (gradiente de 7-10%) de poliacrilamina (SDS) com 17-18 horas de corrida a 120V e corados com Coomassie Blue (Bär and Pette, 1988) ou prata (Blum et al., 1987).

Os géis foram usados para determinar a presença das isoformas de MHC identificadas de acordo com suas respectivas massas moleculares, caracterizando bandas em regiões correspondentes a MHCI, MCHIIa, MCHIIc and MCHIIb. Foi incluída também uma amostra do músculo sóleo como controle, por apresentar em ratos, cerca de 95% de MHCI e 5% de MHCII (Staron et al., 1999).

Análise densitométrica

As bandas de miosina foram escaneadas e capturadas pelo programa Labscan. Em seguida, as imagens foram transferidas para o programa ImageMaster e obtida a percentagem relativa das isoformas I, IIa, IIc e IIb.

Análise estatística

Os resultados foram analisados e expressos através de suas médias e desvio padrão. Significância estatística das diferenças entre as médias de ambos os grupos foram calculadas pelo teste t de Student e Mann Whitney para amostras independentes, através do programa Instat. Significância para $p < 0.05$ foi considerada significativa.

RESULTADOS

Tipos de fibras

O músculo semitendinoso apresentou em todos os animais analisados duas porções distintas, uma vermelha e outra branca. Foram encontrados todos os tipos de fibras puras na região vermelha (I, IIa, IIc e IIb), bem como as híbridas IC, IIC, IIAD e IIDB. Já na região branca foram observadas as fibras puras do tipo IIa, IIc, IIb e as híbridas dos tipos IIAD e IIDB (Fig. 1).

Porcentagem das fibras dos animais do grupo controle (GC)

O músculo semitendinoso foi predominantemente composto por fibras puras do tipo IIb. Por outro lado, as fibras puras do tipo I apareceram em pequena quantidade. As fibras híbridas (IC, IIC, IIAD e IIDB) também foram encontradas, perfazendo menos de 2 % do

total de fibras. Entre as híbridas, as do tipo IIAD foram encontradas em maior quantidade (Tab. 2).

Isoformas de miosina (MHC)

Através da separação eletroforética demonstrou-se a presença das 4 isoformas de miosina, MHCI, IIa, IId e IIb, em todos os animais analisados. Verificou-se a predominância da isoforma IIb. As isoformas IIa e IId demonstraram pequena diferença na distância de migração e proporção semelhante, enquanto a banda I foi discretamente observada (Fig. 2 e 3).

Efeitos do treinamento

Observou-se aumento significativo nas fibras híbridas do tipo IC, IIAD e IIDB. Na porção branca houve aumento significativo das híbridas IIDB. Apesar de não ter sido significativo, houve uma pequena diminuição das fibras do tipo I enquanto que as do tipo IIB tiveram uma queda mais acentuada, quando analisada a porção vermelha e o músculo inteiro. Já na porção branca, observou-se uma tendência do aumento das fibras IIA e IID (Fig. 4, 5 e 6).

Mudanças nas secções transversais das fibras

A área de secção transversal das fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso não sofreu alteração (Tab. 4). Na porção branca, somente as fibras do tipo IIB tiveram aumento significativo em sua área (Tab. 5). Quando as duas porções do músculo foram analisadas, percebeu-se que as fibras híbridas IIDB sofreram hipertrofia (Tab. 3).

Análise densitométrica

A comparação da porcentagem relativa das isoformas de miosina nos dois grupos não apresentou significância. As bandas IIa e IId foram calculadas juntas devido a sua pequena

distância de migração. Apesar de não ter tido variações significativas nos valores, houve um aumento relativo da isoforma IIb e diminuição da I (Tab. 6).

Tabela 1 Protocolo de treinamento intervalado.

Semanas	V (m/min)	T (min)	Int (min)	Rep
1^a	20	5	2	4
2^a	30	2,5	1	4
3^a	32,5	2,5	1	6
4^a	35	2,5	1	6
5^a-8^a	35	2,5	1	6

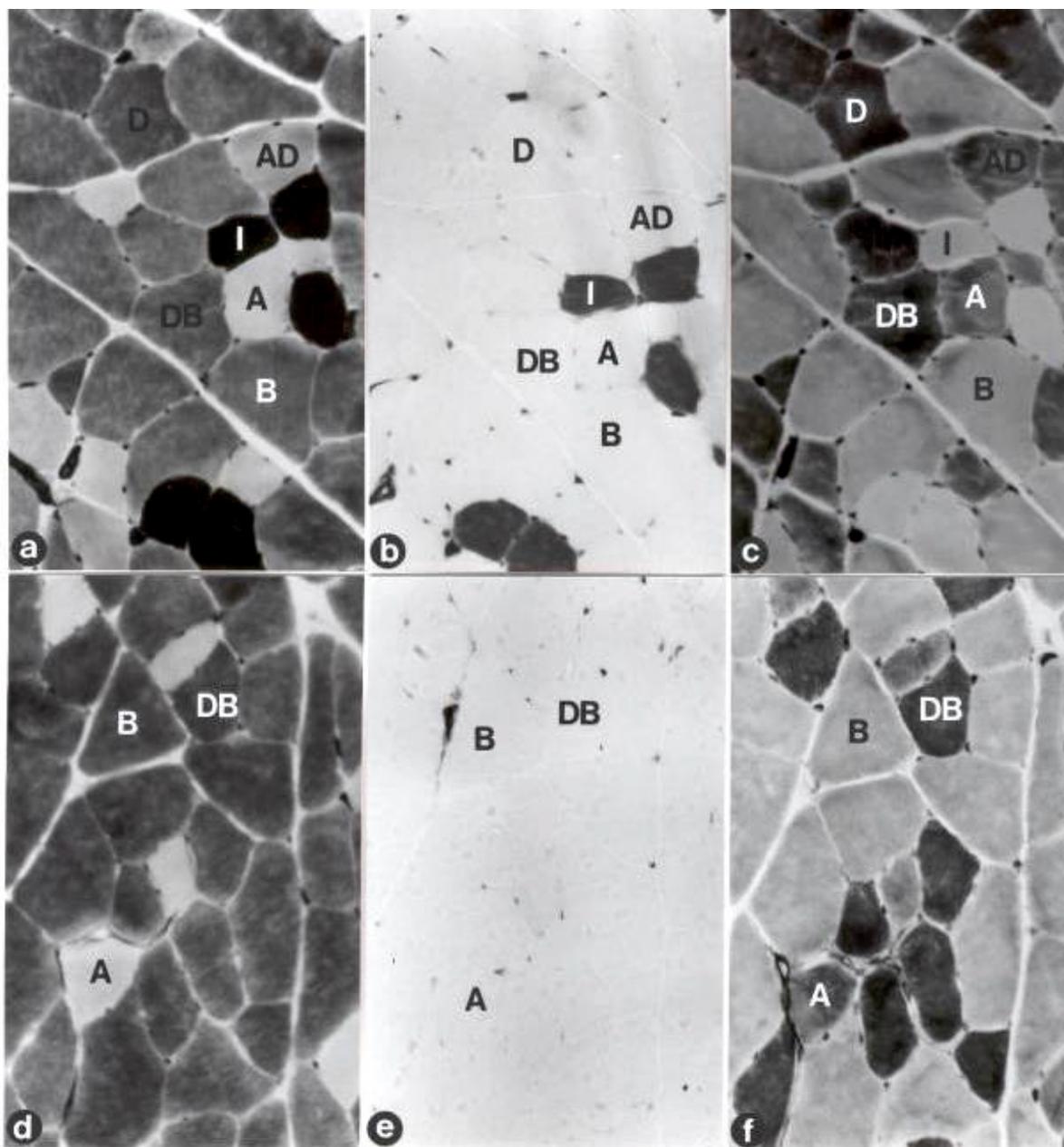


Figura 1 Reação histoquímica de mATPase de secções transversais do músculo semitnedinoso de ratos Wistar. Porção vermelha (a, b, c) e porção branca (d, e, f). pH 4.5 (a, d), 4.3 (b, e) e 10.5 (c, f) I- tipo I, A- tipo IIA, AD- tipo IIAD, D- tipo IID, DB- tipo IIDB e B- tipo IIB.

Tabela 2 Porcentagem dos tipos de fibras musculares no músculo semitendinoso de ratos Wistar. GC, n=8.

Fibras	I	IC	IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
%	5.99	0.16	0.06	10.62	1.18	19.18	0.42	62.39

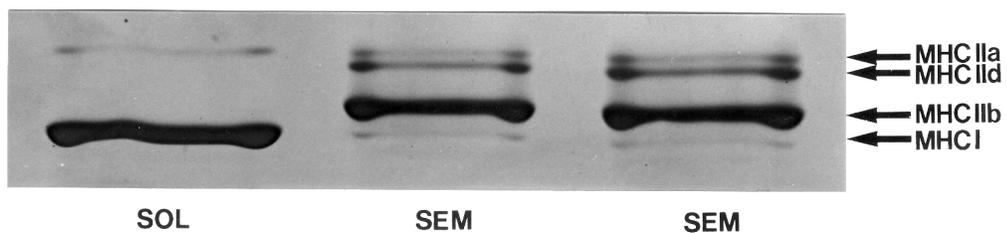


Figura 2 Separação eletroforética das isoformas de miosina (MHC) do músculo semitendinoso de um rato Wistar do GC e GT. SOL – sóleo, SEM – semitendinoso, MHC I – isoforma I, MHCIIb – isoforma IIb, MHCIIc – isoforma IIc, MHCIIa – isoforma IIa. Coloração com prata.



Figura 3 Separação eletroforética das isoformas de miosina (MHC) do músculo semitendinoso de ratos Wistar. MHC I – isoforma I, MHCIIb – isoforma IIb, MHCIIc – isoforma IIc, MHCIIa – isoforma IIa, GTI 1-8 – grupo treinado intervalado, GC 1-4 – grupo controle, SOL – sóleo.

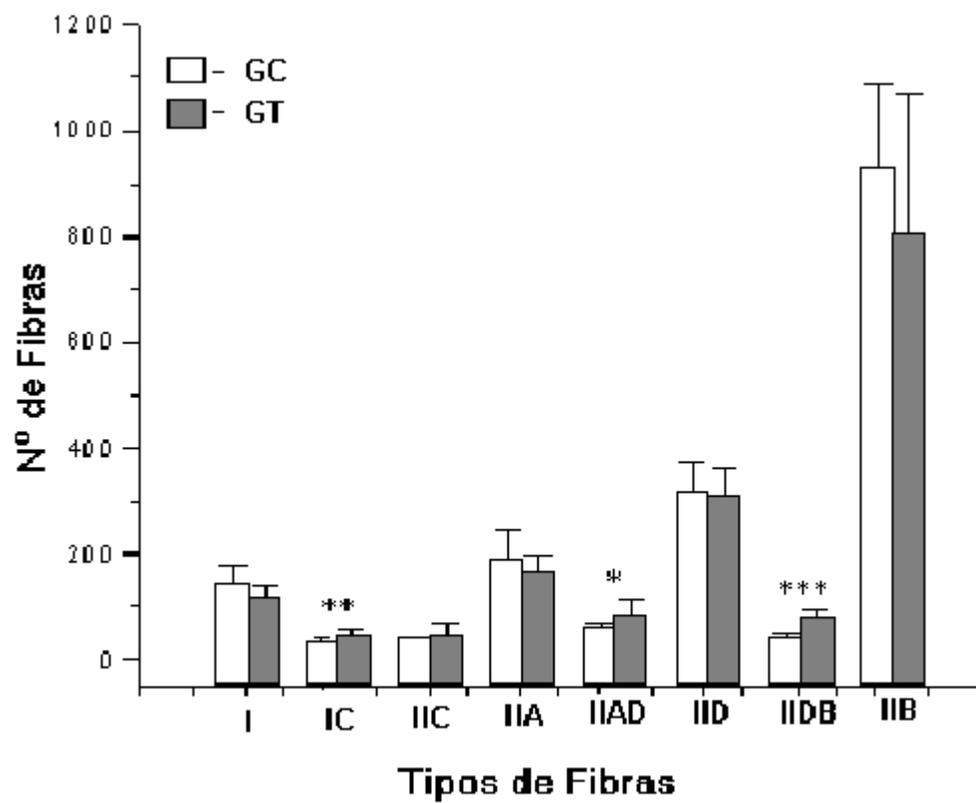


Figura 4 Número de fibras do músculo semitendinoso dos animais do GC e GT. Média e DP. $p < 0.05$.

*significante **muito signficante ***altamente signficante.

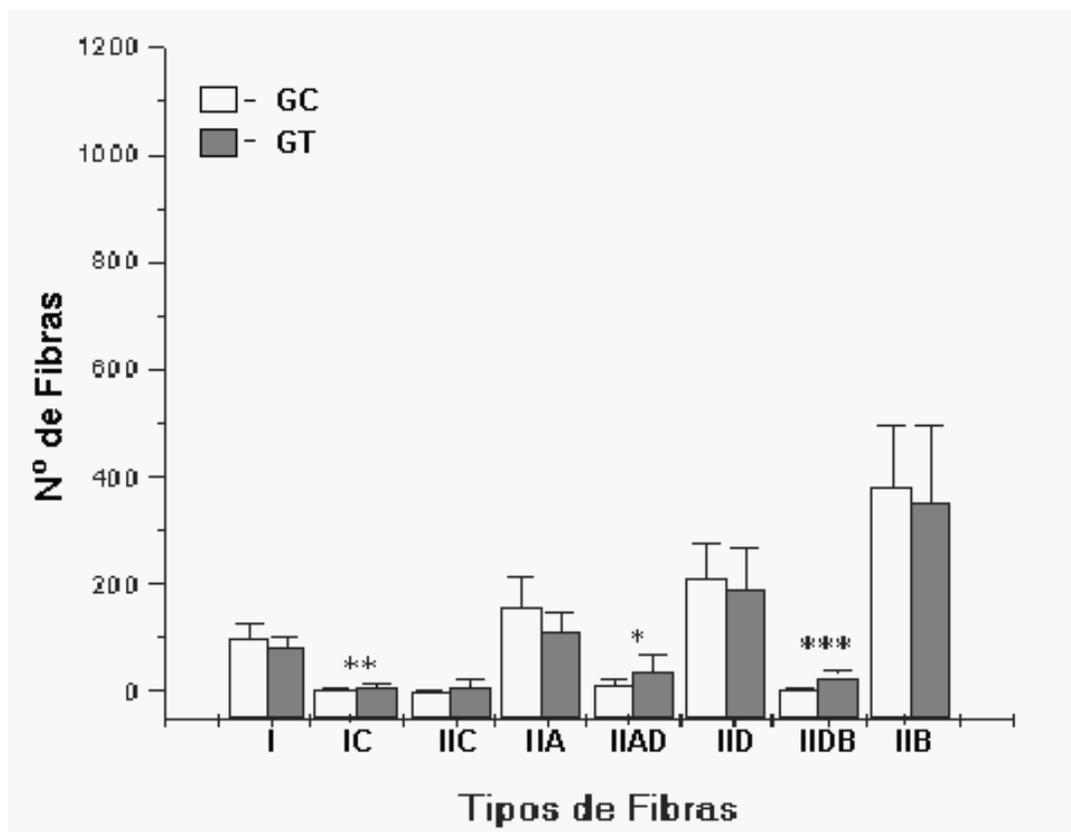


Figura 5 Número de fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso dos animais do GC e GT.

Média e DP. $p < 0.05$. *significante **muito significante ***altamente significante.

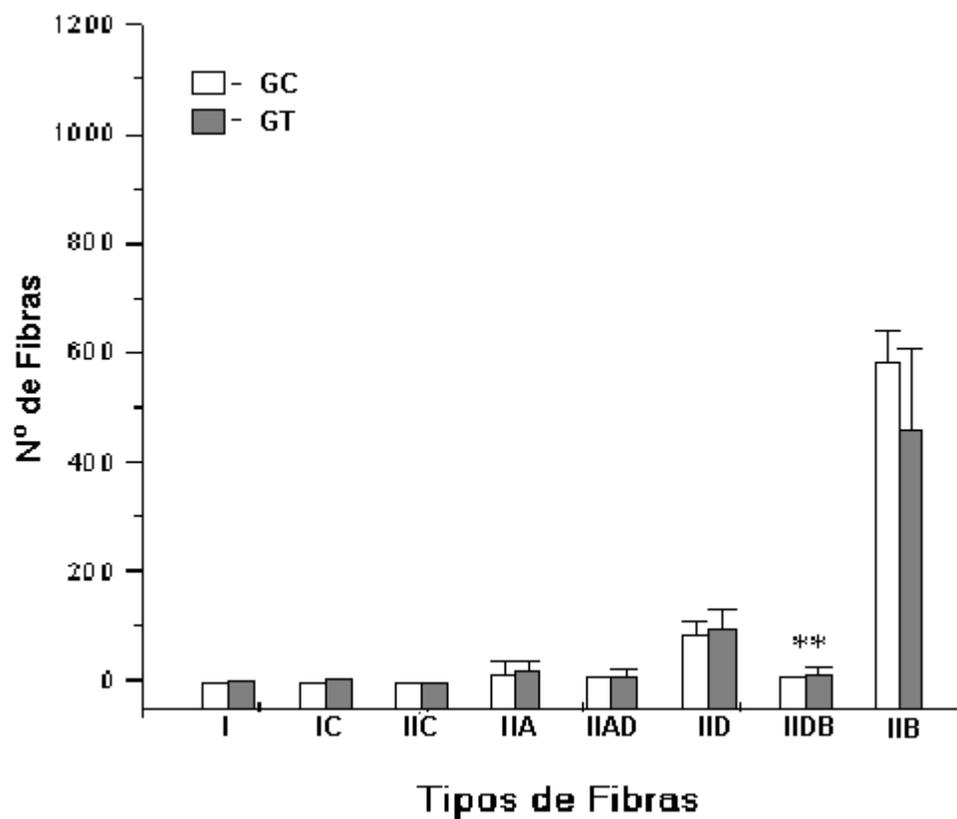


Figura 6 Número de fibras da porção branca do músculo semitendinoso dos animais do GC e GT.

Média e DP. $p < 0.05$. **muito significativa.

Tabela 3 Área de secção transversal das fibras do músculo semitendinoso dos animais do GT e GC. Média e DP. $p < 0.05$.

	Fibras							
	I	IC	IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
GT	1337±222	1397±160	893±349	1519±412	1391±346	1899±471	2176±486*	3249±655
GC	1443±248	1438±490	1269±285	1650±394	1666±309	1853±251	1737±341*	2769±254

* valores estatisticamente significativos

Tabela 4 Área de secção transversal das fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso dos animais do GT e GC. Média e DP. $p < 0.05$.

	Fibras							
	I	IC	IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
GT	1322±234	1379±173	893±349	1511±424	1393±364	1927±497	2059±479	2832±616
GC	1443±252	1438±490	1269±285	1660±408	1685±432	1929±380	1647±474	2626±441

Tabela 5 Área de secção transversal das fibras da porção branca do músculo semitendinoso dos animais do GT e GC. Média e DP. $p < 0.05$.

	Fibras				
	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
GT	1585±414	1464±309	1830±450	2283±873	3729±742*
GC	1582±369	1611±288	1736±290	1923±246	2876±222*

* valores estatisticamente significativos

Tabela 6 Porcentagem relativa das isoformas de miosina (MHC) no músculo semitendinoso de ratos Wistar.

	MHC (%)		
	I	IIa + IIb	IIc
GT	3.32±0.57	31.20±8.41	64.97±9.11
GC	3.87±1.40	33.20±2.81	61.3±6.30

DISCUSSÃO

As isoformas de miosina são caracterizadas como uma família multigênica (Shrager et al., 2000). Algumas aparecem em músculos específicos tais como: os mastigatórios (MHCm), extraoculares (MHCeom), laríngeos (MHCton) e os músculos diafragma e masseter (MHC α) (Pette and Staron, 2000). Outras isoformas expressam-se predominantemente durante o desenvolvimento da musculatura esquelética, são as embriônicas (MHCemb) e as neonatais (MHCneo) (Baldwin and Haddad, 2001). As miosinas amplamente distribuídas nos músculos esqueléticos são as dos tipos MHCI, MHCIIa, MHCIIc e MHCIIb (Termin et al., 1989; Pette and Staron, 2001; Caiozzo et al., 2003). Essas isoformas de miosina caracterizam dois grupos principais de fibras musculares, um de contração lenta e outro de contração rápida, que vão se diferir de acordo com seu metabolismo para produção de energia (Vandenborne et al., 1995; Staron, 1997).

O grupo de contração lenta, formado pelas fibras puras do tipo I que expressam MHCI, utiliza a via oxidativa (Demirel et al., 1999; Allen et al., 2001), permitindo um longo período de contração e maior resistência à fadiga, o que faz com que sejam mais eficientes e mais econômicas em movimentos de longa duração (Goldspink, 1998; Mannion, 1999).

O outro grupo é formado pelas fibras puras IIA, IID e IIB nas quais as isoformas de miosina são Iia, Iid e Iib, respectivamente (Staron et al., 1999). As fibras do tipo IIA são as mais lentas, também chamadas de glicoxidativas por terem dois caminhos para obtenção de energia. As IID e IIB utilizam a via glicolítica, sendo as do tipo IIB mais rápidas e as IID, intermediária entre as do tipo IIA e IIB (Lin et al., 2002). Todas essas fibras são recrutadas

em maior quantidade nas atividades de força e velocidade (Jurie et al., 1995; Bottinelli and Reggiani, 2000; Talmadge, 2000).

Entre as fibras puras, encontram-se as híbridas, podendo expressar dois ou mais tipos de miosina, por exemplo: IC = MHCI > MHCIIa, IIC = MHCIIa = MHCI, IIAC MHCIIa > MHCI, IIAD = MHCIIa > MHCIIb, IIDA = MHCIIb > MHCIIa, IIDB = MHCIIb > MHCIIa. Dessa forma, pode-se delinear no mínimo 10 tipos diferentes de fibras musculares em ratos: I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAD, IIDA, IID, IIDB e IIB e, em humanos é possível obter no mínimo 7 tipos: I, IC, IIC, IIAC, IIA, IIAD, IID (Pette and Staron, 2000).

Nesse trabalho delinear-se os tipos de fibras presentes no músculo semitendinoso de ratos Wistar. De acordo com a análise histoquímica, houve a ocorrência de todas as fibras puras. As fibras de contração rápida (IIA, IID e IIB) foram as mais expressivas, perfazendo um total de 92.2% do fenótipo muscular, das quais as fibras puras IIB contribuíram para um percentual em torno de 60%. Assim sendo, o músculo semitendinoso pode ser classificado como um músculo essencialmente de contração rápida. Notou-se também a presença de fibras musculares híbridas dos tipos IC, IIC, IIAD e IIDB na porção vermelha e IIAD e IIDB na porção branca.

Alguns trabalhos realizados com o músculo semitendinoso em outras espécies de animais chegaram a resultados que ratificam essas informações. Delp e Duan (1996) encontraram 59% de fibras IIB, 24% de IID, 11% de IIA e 6% de I em ratos Sprague-Dawley. Jurie et al. (1995) em gatos machos Limousin descobriram 70% de fibras entre os tipos IIB e IID, 21% de IIA e 9% de I. Em trabalhos realizados com touros, Jurie e colab. (1998) encontraram mais de 50% de fibras do tipo IIB, 22% de IIA, 8% de híbridas IIAB e 10% de fibras do tipo I.

A separação eletroforética das isoformas de miosina nas amostras do músculo semitendinoso demonstrou em todos os animais a presença de quatro bandas. A banda IIB foi encontrada em maior quantidade, seguida da IID, IIA e I, respectivamente. Dessa forma, esses dados confirmam a existência e a proporcionalidade das fibras do tipo IIB, IID, IIA e I observadas na análise histoquímica.

Um aspecto importante das fibras musculares é sua plasticidade em resposta a estímulos, fazendo com que a expressão de suas isoformas de miosina se altere, promovendo transição entre os tipos de fibras. Alterações na atividade neuromuscular, nos níveis hormonais, estimulação elétrica, carga mecânica e exercício físico são alguns dos estímulos que interferem na distribuição das fibras.

O exercício físico é um fator importante sobre a conversão do fenótipo muscular. Ele é capaz de levar a uma transição bidirecional das fibras: $I \Leftrightarrow IC \Leftrightarrow IIC \Leftrightarrow IIA \Leftrightarrow IIAD \Leftrightarrow IIDA \Leftrightarrow IID \Leftrightarrow IIDB \Leftrightarrow IIBD \Leftrightarrow IIB$ (Harridge et al., 1998). Assim, um treinamento com exercícios de baixa intensidade e longa duração pode induzir uma conversão de fibras no sentido de IIB para I; em oposição, um treino de alta intensidade e curta duração pode surtir efeito contrário, de I para IIB (Demirel et al., 1999; Caiozzo et al., 2000; Campos et al., 2002).

O treinamento intervalado causou alterações das fibras musculares do semitendinoso. Na região branca, houve transição das fibras no sentido de IIB para IID, pois, observou-se uma diminuição das fibras do tipo IIB, um aumento significativo das híbridas IIDB e um pequeno aumento das fibras IID. Quando se observa novamente o gráfico da região branca, nota-se também um aumento, apesar de não significativo, das fibras IIA, podendo levantar a hipótese de que as fibras nessa porção estejam sendo

induzidas à transição, pelo treinamento intervalado, em direção aquelas fibras que utilizam a via glicoxidativa (IIA) como meio para obtenção de energia. Na região vermelha, houve diminuição das fibras puras do tipo IIB, IID, IIA, I e, aumento significativo das fibras híbridas IIDB, IIAD e IIC. A diminuição das fibras I e IIB, mesmo que não significativa, pode evidenciar uma transformação bidirecional ao mesmo tempo das fibras musculares pelo treinamento intervalado (Fitts et al., 1989; Harridge et al, 1998). Estudos têm sugerido que treinamento intervalado em sprint pode induzir uma transição bidirecional em direção as fibras do tipo IIA por uma conversão das isoformas presentes nas fibras I e IIB (Luginbuhl et al., 1984; Esbjörnsson et al, 1993), proporcionando um melhor aproveitamento da energia, pois a quantidade de ATP produzido por uma fibra do tipo IIA é maior do que o da fibra do tipo IIB, resultando assim numa melhora da performance. Isto leva a acreditar que o treinamento aplicado pode ter induzido mudanças nos níveis de MHC dentro das fibras do músculo semitendinoso através de perturbações nos genes que expressam essas proteínas (Harrison et al., 2002), promovendo transição das fibras musculares em direção aquelas que não utilizam exclusivamente a via aeróbia ou anaeróbia para obtenção de energia.

Mudanças na secção transversal das fibras musculares são percebidas durante um determinado treinamento físico, o que caracteriza um aumento na síntese das proteínas contrateis, entre elas as miosinas (Booth et al., 1998). Nesse trabalho, não houve mudanças significativas no tamanho das fibras musculares da região vermelha. Já na região branca houve um expressivo aumento da área das fibras IIB e no músculo inteiro pode ser visto uma hipertrofia nas fibras IIBD, ambas representantes do grupo de contração rápida. De acordo como estudos anteriores, as fibras mais recrutadas em exercícios de curta duração

são as de contração rápida, o que poderia induzir uma alta produção das proteínas de algumas dessas fibras, causando hipertrofia das mesmas (Bottinelli and Reggiani, 2000; Talmadge, 2000; Lin et. al., 2002). Notou-se que, apesar de não significativa, teve um aumento do volume da banda IIB, levantando a hipótese de que houve aumento na síntese dessa miosina.

Em conclusão, demonstrou-se que o músculo semitendinoso é composto essencialmente por fibras de contração rápida. Que o treinamento intervalado foi capaz de promover transição das fibras musculares, com aumento significativo das fibras híbridas IIC-IIAD-IIDB, e uma hipertrofia nas fibras de contração rápida IIDB e IIB.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro, processo nº 133411/2003. Ao Departamento de Anatomia e Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia – UNICAMP, por ceder seus espaços e equipamentos.

REFERÊNCIAS

- Allen DL, Harrison BC, Maas A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA (2001) Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 90: 1900-1908
- Andersen JL, Schjerling P, Saltin B (2000) Muscle, genes, and athletic performance. *Sci Am* 283: 48-55
- Baldwin KM, Haddad F (2001) Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345-357

- Bär A, Pette D (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2): 93-99
- Booth FW, Tseng BS, Flück M, Carson JA (1998) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand* 162: 343-350
- Bottinelli R, Reggianni C (2000) Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Bio* 73: 195-262
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence *J Histochem Cytochem* 18: 670-672
- Caiozzo VJ, Haddad F, Baker M, McCue S, Baldwin KM (2000) MHC polymorphism in rodent plantaris muscle: effects of mechanical overload and hypothyroidism. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C709-C717
- Caiozzo VJ, Baker MJ, Huang K, Chou H, Wu YZ, Baldwin KM (2003) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R570-R580
- Campos GER, Luecke T, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratames NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88: 50-60
- Delp MD, Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 80: 261-270.
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS (1999) Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86(3): 1002-1008

- Esbjörnsson M, Hellsten-Westing Y, Balsom PD, Sjodin B, Jansson E (1993) Muscle fibre type changes with sprint training: effect of training pattern. *Acta Physiol Scand* 149: 245-246
- Fitts RH, Costill DL, Gardetto PR (1989) Effect of swim exercise training on human muscle fiber function. *J Appl Physiol* 66 (1): 465-475
- Goldspink G (1998) Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comp Biochem Phys* 120 (part b): 5-15
- Guth L, Samaha FJ (1970) Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol* 28: 365-367
- Harridge SDR, Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino M, Reggiani C, Esbjörnsson M, Balsom PD, Saltin B (1998) Sprint training, in vitro and in vivo muscle function, and myosin heavy chain expression. *J Appl Physiol* 84(2): 442-449
- Harrison BC, Bell ML, Allen DL, Byrnes WC, Leinwand LA (2002) Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. *J Appl Physiol* 92: 313-322
- Jurie C, Robelin J, Brigitte P, Geay Y (1995) Post-natal changes in the biological characteristics of semitendinosus muscle in male Limousin cattle. *Meat Science* 41: 125-135
- Jurie C, Picard B, Geay Y (1998) Influences of the method of housing bulls on their body composition and muscle fibre types. *Meat Science* 50: 457-469
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman B (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797-801.
- Luginbuhl AJ, Dudley GA, Staron RS (1984) Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry* 81: 55-58

- Mannion AF (1999) Fibre type characteristics and function of the human paraspinal muscles: normal values and changes in association with low back pain. *J Electromyography and Kinesiology* 9: 363-377
- Pette D, Staron RS (1993) The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100: 149-153
- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types and transitions. *Microscopical Research and Techniques* 50: 500-509
- Pette D, Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochemical Journal* 115: 359-372
- Shrager SJ, Desjardins PR, Burkman JM, Konig SK, Stewart DR, Su L, Shah MC, Bricklin E, Tewari M, Hoffman R, Rickels MR, Jullian EH, Rubinstein NA, Stedman HH (2000) Human skeletal myosin heavy chain genes are tightly linked in the order embryonic-IIa-IIId/x-IIb-perinatal-extraocular. *J Muscle Res Cell Motil* 21: 345-355
- Smolka MB, Zoppi CC, Alvez AA, Silveira LR, Marangoni S, Silva LP, Novello J, Macedo DV (2000) HSP72 as a complimentary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: R1539-R1545
- Staron RS (1997) Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* 22(4): 307-327
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GER (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochemical Journal* 111: 117-123
- Suwa M, Nakano H, Yasuki H, Nakamura T, Katsuta S, Kumagai S (2003) Increased wheel-running activity in the genetically skeletal muscle fast-twitch fiber-dominant rats. *J Appl Physiol* 94: 185-192

- Tajsharghi H, Sunnerhagen KS, Darin N, Kyllerman M, Oldfors A (2004) Induced shift in myosin heavy chain expression in myosin myopathy by endurance training. *J Neurol* 251: 179-183
- Talmadge RJ (2000) Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 23: 661-679
- Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles: a single fiber study. *Eur J Biochem* 186: 749-754
- Vandenborne K, Walter G, Ploutz-Snyder L, Staron R, Fry A, Meirleir K, Dudley GA, Leigh JS (1995) Energy-rich phosphates in slow and fast human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268 (Cell Physiol 37): C869-C876

ANEXOS

Figura 1' Ilustração gráfica dos tipos de fibras musculares esqueléticas de ratos para a técnica histoquímica de mATPase após pré-incubações nos pHs 4.3, 4.5 e 10.5 (Staron et al. 1999). Os desenhos representam secções transversais das fibras musculares com seus respectivos níveis de coloração. Compare com a microfotografia da Figura 1, pg.38.

	4.3	4.5	10.5
I			
IC			
IIC			
IIA			
IIAD			
IID			
IIDB			
IIB			

Table 1' Protocolo do período de adaptação.

Dias	V (m/min)	T (min)	Int (min)	Rep
Segunda	10	10	2	3
Terça	10	10	2	3
Quarta	15	10	2	3
Quinta	15	10	2	3
Sexta	20	10	2	3
Sábado	20	10	2	3

Tabela 2' Protocolo de treinamento intervalado.

Semanas	V (m/min)	T (min)	Int (min)	Rep
1^a	20	5	2	4
2^a	30	2,5	1	4
3^a	32,5	2,5	1	6
4^a	35	2,5	1	6
5^a-8^a	35	2,5	1	6

Tabela 3' Número de fibras do músculo semitendinoso de cada animal do GC e GT. Dados foram tratados e expressos na forma de gráfico, pg. 42.

Fibras																
Ratos	I	I	IC	IC	IIC	IIC	IIA	IIA	IIAD	IIAD	IID	IID	IIDB	IIDB	IIB	IIB
1	68	100	2	21	4	23	119	98	18	30	201	241	13	59	710	603
2	140	59	8	10	-	49	175	83	16	31	309	313	9	24	848	715
3	142	97	2	18	-	-	124	143	10	32	321	217	7	38	1202	807
4	84	49	-	8	1	-	241	141	6	68	411	262	5	48	879	433
5	112	98	-	11	-	-	240	129	30	87	270	249	-	52	1104	1030
6	70	79	7	7	-	3	103	182	5	53	243	326	-	58	1033	1101
7	60	98	1	2	2	6	121	187	23	84	307	384	8	42	1019	1236
8	127	100	-	9	-	2	177	84	36	11	286	298	9	38	841	587
Total	803	680	20	86	7	83	1300	1047	144	396	2348	2290	51	359	7636	6512
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT

Tabela 4' Número de fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso de cada animal do GC e GT. Dados foram tratados e expressos na forma de gráfico, pg. 43.

Fibras																
Ratos	I	I	IC	IC	IIC	IIC	IIA	IIA	IIAD	IIAD	IID	IID	IIDB	IIDB	IIB	IIB
1	67	100	2	17	4	22	117	86	17	22	152	124	5	45	240	318
2	139	59	8	10	-	49	168	69	12	18	226	244	5	19	263	289
3	142	97	2	16	-	-	122	142	8	32	253	158	4	29	588	321
4	75	49	-	7	-	-	230	105	6	32	337	95	5	11	318	131
5	111	98	-	11	-	-	239	111	24	73	181	173	-	33	458	471
6	120	77	7	7	-	3	80	122	-	46	116	198	-	30	374	477
7	60	85	1	2	2	6	158	185	13	84	203	324	2	36	452	562
8	67	99	-	9	-	2	155	84	32	6	212	229	6	29	351	260
Total	781	664	20	79	6	82	1269	904	112	313	1680	1545	27	232	3044	2829
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT

Tabela 5' Número de fibras da porção branca do músculo semitendinoso de cada animal do GC e GT. Dados foram tratados e expressos na forma de gráfico, pg. 44.

Fibras																
Ratos	I	I	IC	IC	IIC	IIC	IIA	IIA	IIAD	IIAD	IID	IID	IIDB	IIDB	IIB	IIB
1	1	-	-	4	-	1	2	12	1	8	49	117	8	14	470	285
2	-	-	-	-	-	-	7	14	4	13	83	69	4	5	585	426
3	-	-	-	2	-	-	2	1	2	-	68	59	12	12	614	486
4	-	-	-	1	-	-	11	36	-	36	74	167	-	37	561	302
5	-	-	-	-	-	-	1	18	6	14	89	76	-	19	646	559
6	-	-	-	-	-	-	23	60	5	6	127	128	-	28	659	624
7	-	-	-	-	-	-	63	2	10	-	114	60	6	6	567	674
8	-	-	-	-	-	-	22	0	4	5	74	69	3	9	590	327
Total	1	-	-	7	-	1	131	143	32	82	678	745	33	130	4692	3683
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT

Tabela 6' Área de secção transversal das fibras do músculo semitendinoso de cada animal do GT e GC. Média de cada animal. Dados foram tratados e expressos na tabela pg. 45.

Fibras																
Ratos	I	I	IC	IC	IIC	IIC	IIA	IIA	IIAD	IIAD	IID	IID	IIDB	IIDB	IIB	IIB
1	1551	1491	1872	1378	998	1143	1699	1666	1897	1489	2204	2204	2099	2370	3186	4125
2	1329	1758	1328	1504	-	1267	1575	1853	1730	1554	1877	2237	2190	2611	2912	3706
3	1052	1334	633	1320	-	-	955	1802	1325	1660	1315	1765	1703	2266	2581	2880
4	1291	1303	-	1330	1568	-	1191	1799	1135	1784	1790	2333	1494	2721	2718	3435
5	1346	1124	-	1391	-	-	1800	1229	1581	1027	1882	1466	-	1818	2555	2303
6	1419	1065	1687	1260	-	701	1931	1178	1782	978	1995	1560	-	1728	2973	2699
7	1804	1201	1670	1742	1240	399	2008	758	2093	956	1921	1172	1608	1358	2408	2869
8	1748	1419	-	1255	-	954	2044	1863	1783	1681	1843	2459	1327	2536	2820	3972
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT

Tabela 7' Área de secção transversal das fibras da porção vermelha do músculo semitendinoso de cada animal do GT e GC. Média de cada animal. Dados foram tratados e expressos na tabela pg. 46.

Fibras																
Ratos	I	I	IC	IC	HC	HC	HA	HA	HAD	HAD	HD	HD	HDB	HDB	HB	HB
1	1551	1491	1872	1237	998	1143	1700	1621	1938	1382	2531	2087	1953	1889	3417	3042
2	1329	1758	1328	1504	-	1267	1583	1954	1793	1577	2129	2427	2261	2811	2965	3419
3	1052	1334	633	1380	-	-	955	1799	1167	1660	1245	1829	1501	2182	2473	2420
4	1291	1242	-	1262	1568	-	1185	1739	1135	1837	1846	2180	1494	2073	2623	2634
5	1346	1112	-	1391	-	-	1800	1206	1572	1061	1618	1483	-	1801	2060	2303
6	1410	1017	1687	1260	-	701	1888	1145	-	936	1928	1620	-	1691	2355	2715
7	1824	1201	1670	1742	1240	399	2063	758	2346	956	2051	1160	-	1383	2240	2149
8	1743	1419	-	1255	-	954	2108	1863	1843	1738	2082	2635	1027	2640	2867	3972
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT

Tabela 8' Área de secção transversal das fibras da porção branca do músculo semitendinoso de cada animal do GT e GC. Média de cada animal. Dados foram tratados e expressos na tabela pg. 47.

Ratos	Fibras									
	IIA	IIA	IIAD	IIAD	IID	IID	IIDB	IIDB	IIB	IIB
1	1631	1998	1195	1785	1507	2319	2225	4038	2956	5209
2	1415	1541	1349	1524	1569	1954	2102	1849	2859	3994
3	954	2084	1956	-	1425	1651	1904	2469	2689	3340
4	1250	1881	-	1745	1717	2409	-	2925	2813	3836
5	1768	1354	1609	867	2281	1443	-	1858	3050	3212
6	2068	1242	1782	1303	2035	1487	-	1767	3289	2683
7	1896	992	1777	1467	1773	1193	1608	1203	2577	3588
8	1674	-	-	1556	1577	2184	1776	2157	2772	3971
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT