

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ÂNGELA CRISTINA ITO

EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS CRONICAMENTE TRATADOS COM
L-NAME. ESTUDOS HISTOENZIMOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
IMUNOHISTOQUÍMICOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>ÂNGELA CRISTINA ITO</u> <u>[Assinatura]</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

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

Orientadora: Profa.Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

It6

Ito, Ângela Cristina

Expressão da óxido nítrico sintase em músculo esquelético de ratos cronicamente tratados com L-NAME: estudos histoenzimológicos, bioquímicos e imunohistoquímicos / Ângela Cristina Ito. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Maria Alice da Cruz-Höfling.

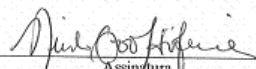
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Músculo esquelético. 2. Óxido nítrico. 3. Óxido nítrico sintase. 4. L-NAME. 5. Fibras musculares - Tipos.
I. Maria Alice da Cruz-Höfling. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 18 de fevereiro de 2005

Banca Examinadora

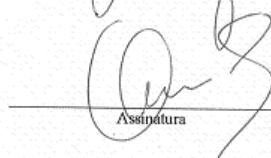
Profª.Dra. Maria Alice da Cruz Höfling (Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Maria Julia Marques


Assinatura

Prof.Dr. Armindo Antonio Alves


Assinatura

Prof.Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Dedico este Trabalho...

À minha mãe que sempre me incentivou e foi um exemplo de pessoa.

Ao meu pai e à minha irmã que estiveram presentes em todos os momentos e permitiram a realização deste sonho.

Agradecimento Especial...

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling,
pela orientação, dedicação e ensinamentos
que contribuíram para o meu crescimento
durante o curso de Mestrado.

Agradecimentos

Aos professores Dr. Stephen Hyslop e Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos pela amizade, colaboração e por terem disponibilizado toda a infra-estrutura necessária para desenvolver parte deste trabalho.

Aos professores Dra. Maria Júlia Marques, Dr. Armindo Antonio Alves pela honra em tê-los como membros da banca.

Aos professores Dra. Maria Júlia Marques, Dra. Maeli Dal Pai-Silva e Dr. Edson Rosa Pimentel pelas sugestões sugeridas durante a análise prévia da tese, que enriqueceram e contribuíram para a finalização deste trabalho.

À Marta Beatriz Leonardo pelo inestimável apoio técnico e pela amizade e carinho dispensados.

À Erika pela amizade, carinho e principalmente pela solidariedade nos “momentos difíceis”, não só durante a execução deste trabalho mas, em todos os momentos.

À Petra, Carolina, Luciana, Rosana, Camila, Maria Carolina, Gustavo, Solange, Christiane, Patrícia, Elisa, Fabíola e Márcia pela amizade, incentivo e apoio prestados.

Aos funcionários dos Departamentos de Histologia & Embriologia, Departamento de Anatomia e Departamento de Farmacologia que contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos funcionários dos Departamentos de Histologia & Embriologia, Departamento de Biologia Celular pela prestatividade e auxílio na execução de itens burocráticos.

Ao CNPq, FAPESP e FAEPEX-UNICAMP pelo suporte financeiro.

E a todos, não citados nominalmente aqui, que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular: Estudo de Venenos e Toxinas em Sistemas Biológicos do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia (IB), sob coordenação da Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling, no Laboratório sob coordenação do Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos do Departamento de Anatomia (DA) do Instituto de Biologia (IB), e no Laboratório de Farmacologia Bioquímica, sob coordenação do Prof. Dr. Stephen Hyslop do Departamento de Farmacologia (DF) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Portanto, colaboraram diretamente para a execução deste trabalho o Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos (DA/IB) e o Prof. Dr. Stephen Hyslop (LBF/DF/FCM).

A realização da pesquisa contou com o apoio direto ou indireto das seguintes instituições de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Bolsa de Mestrado por dois anos, Auxílio à Pesquisa (Demanda Universal - Proc. 477586/2003-1).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Proc. 98/06700-2, Proc. 96/11653-8).
- Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX/UNICAMP – Proc. 1165/01).

SUMÁRIO

1. RESUMO	10
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUÇÃO	13
3.1. Considerações Gerais sobre o Músculo Estriado Esquelético	13
3.1.1. Crescimento Axonal Externo	13
3.1.2. Miogênese	14
3.1.3. Sinaptogênese	15
3.1.4. Eliminação de Sinapses	16
3.2. A Fibra Muscular Esquelética	17
3.2.1. Tipos de Fibras Musculares Esqueléticas	19
3.2.2. Desenvolvimento de Tipos de Fibras Musculares	20
3.2.3. ATPase miofibrilar (mATPase)	21
3.3. Óxido Nítrico	21
3.3.1. Óxido Nítrico Sintases	24
3.3.2. O Óxido Nítrico no Músculo Esquelético	24
3.4. OBJETIVOS	27
4. Artigo 1 – Histochemical analysis of <i>soleus</i> and <i>extensor digitorum longus</i> muscles from rats treated with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)	28
4.1. Abstract	30
4.2. Introduction	30
4.3. Material and Methods	32
4.4. Results	33
4.5. Discussion	34
4.6. References	37
4.7. Figures	41

5. Artigo 2 – Chronic treatment with N ^o -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) does not affect the expression of nitric oxide synthase in rat <i>soleus</i> and <i>extensor digitorum longus</i> muscles	45
5.1. Abstract	47
5.2. Introduction	47
5.3. Material and Methods	49
5.4. Results	51
5.5. Discussion	52
5.6. References	53
5.7. Tables	57
5.8. Figures	58
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, de vida curta, que modula a neurotransmissão, a força de contração, o metabolismo de glicose, o tônus vascular e a função muscular em geral. O músculo esquelético é a maior fonte de NO em mamíferos e expressa todas as três isoformas de NO sintases (NOS). Os inibidores da NOS são ferramentas usadas para estudar a função do NO na fisiologia muscular.

Neste trabalho, nós examinamos os efeitos do tratamento crônico de ratos com N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que bloqueia a síntese de NO pelas NOSs, através de parâmetros bioquímicos e morfológicos dos músculos *soleus* e *extensor digitorum longus*. A tipagem das fibras musculares, a medida da área de secção transversal das fibras, a expressão das isoformas de miosina, a determinação do número dos núcleos da fibra muscular e, a expressão e imunolocalização da NOS endotelial e neuronal foram parâmetros usados para avaliar os efeitos da falta de NO nos músculos. Os ratos foram tratados com L-NAME (20 mg/rato/dia, na água de beber dos animais) por duas, quatro e oito semanas. Decorridos esses tempos, os animais foram sacrificados e os músculos removidos e processados para análises. O tratamento crônico dos ratos com L-NAME causou um pequeno (13.2%), porém significativo, decréscimo na porcentagem das fibras tipo I, após duas semanas de tratamento, e aumento na área de secção transversal das fibras IID, após oito semanas de tratamento, no músculo *soleus*. Não houve diferenças significativas na porcentagem dos tipos de fibras, ou em suas áreas de secção transversal no músculo *extensor digitorum longus*. O número de núcleos da fibra muscular, também usado como um indicador de hipertrofia da fibra, não apresentou diferenças significativas nos ratos tratados com L-NAME. Igualmente, não houve alterações significativas na expressão e distribuição das NOSs endotelial e neuronal, ou na expressão das isoformas de miosina de ambos os músculos.

Estes resultados mostram que a inibição crônica da biossíntese de NO pelo L-NAME, nos períodos pesquisados, em geral não altera os vários parâmetros estudados

nos músculos *soleus* e *extensor digitorum longus*, exceto para as fibras tipo I e tipo IID no músculo *soleus*.

2. ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a short-lived gas molecule that modulates neurotransmission, contractile force, glucose metabolism, vascular tone, and muscle function in general. Skeletal muscle is a major source of NO in mammals and expresses all three isoforms of NO synthases (NOS). Inhibitors of the NOS are useful tools for studying the role of NO in muscle physiology.

In this work, we examined the effects of chronic treatment of rats with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), which blocks the synthesis of NO by NOSs, through selected biochemical and morphological parameters of *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles. Fiber typing, fiber cross-sectional area, expression of myosin isoforms, number of muscle fiber nuclei, and the expression and immunolocalization of endothelial and neuronal NOS were used to assess the effects of NO deprivation. Rats were treated with L-NAME (20 mg/rat/day, in the drinking water) for two, four and eight weeks, after which the animals were sacrificed and the muscles removed and processed for analysis. The chronic treatment of rats with L-NAME caused a slight (13.2%) but significant decrease in the percentage of type I fibers after two weeks of treatment and in the cross-sectional area of IID fibers after eight weeks of treatment in *soleus* muscle. There were no significant differences in the percentage of fiber types or in their cross-sectional areas in the EDL. The number of muscle fiber nuclei, also used as an indicator of hypertrophy, did not show significant differences in the treated rats. Likewise, there were no significant changes in the expression and distribution of endothelial and neuronal NOS, or in the expression of myosin isoforms.

These results show that the chronic inhibition of NO biosynthesis by L-NAME in the time intervals examined, generally did not alter the various parameters studied in rat *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles, except for type I and IID fibers in *soleus* muscle.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Considerações Gerais sobre o Músculo Estriado Esquelético

A estrutura dos tecidos reflete suas funções. No caso do músculo estriado esquelético, sua função é gerar força e/ou produzir movimento. Desta forma, o músculo esquelético representa o clássico exemplo onde a relação estrutura-função está perfeitamente ilustrada. Por conta desta íntima relação entre estrutura e função do tecido muscular, estudos sobre a sua função estarão implicados estreitamente com os estudos sobre estrutura muscular, e vice versa.

Durante o processo de desenvolvimento do músculo, quatro fases principais podem ser destacadas, lembrando que algumas dessas fases podem ocorrer simultânea e coordenadamente. A primeira fase compreende o crescimento axonal externo, que é o processo pelo qual os axônios motores deixam a raiz ventral e dirigem-se para a periferia para contatar as fibras musculares. A segunda fase é a da miogênese, com a formação da célula muscular, segue-se a ela a sinaptogênese, quando ocorre a formação das junções neuromusculares entre nervo motor e fibra muscular, e, por fim, a quarta fase, que é a da eliminação de sinapses, processo pelo qual sinapses neuromusculares excedentes são eliminadas (LIEBER, 1992).

3.1.1. Crescimento Axonal Externo

O crescimento axonal externo é um estágio importante já nos primórdios da formação das primeiras conexões sinápticas entre as fibras musculares e as nervosas.

Quando um músculo é requerido a contrair-se, são enviadas as instruções necessárias através de impulsos nervosos, sob a forma de potenciais de ação, gerados nos corpos celulares dos grandes neurônios situados na porção cinzenta ventral da medula espinhal. Estas células são denominadas motoneurônios, e existem em número de cem ou mais para cada músculo. Um motoneurônio consiste de um corpo celular ou soma, e de inúmeros prolongamentos, os dendritos e o axônio (MCCOMAS, 1996).

3.1.2. Miogênese

Os músculos esqueléticos são derivados dos somitos presentes a intervalos ao longo do comprimento dos embriões. São derivados da parte dorsal do mesoderma, que se divide sob a influência de genes reguladores, em blocos segmentados de tecido embrionário (LIEBER, 1992; HAUSCHKA, 1994; MCCOMAS, 1996).

Os somitos dão origem aos músculos miotomais primitivos, que posteriormente formam os músculos extensores axiais da coluna vertebral, os músculos do corpo e os músculos apendiculares.

O processo de miogênese ocorre em vários estágios. Primeiramente ocorre proliferação celular dos somitos, que se multiplicam sob a influência de fatores de crescimento de natureza peptídica (HAUSCHKA, 1994; MCCOMAS, 1996). À medida que o desenvolvimento prossegue, formam-se células mononucleadas dentro dos somitos, com núcleo central, denominadas mioblastos, que são as primeiras células precursoras das fibras musculares. Os mioblastos não diferem morfológicamente de suas células mesodermas ancestrais. São envoltos por uma membrana basal. Ainda sob a influência de fatores de crescimento, ou peptídeos, e de genes reguladores, os mioblastos proliferam através de mitoses e formam agrupamentos, constituindo assim um dos primeiros estágios da miogênese. Ocorre, a seguir, alinhamento dos mioblastos, tendo como diretriz a membrana basal do mioblasto primordial. Concomitantemente desenvolvem-se estruturas eletrondensas que se assemelham às junções do tipo *gap*, e inicia-se a síntese das proteínas contráteis. Nesta fase também ocorre entrada de Ca^{2+} que irá promover a despolarização da membrana promovendo a fusão dos mioblastos em miotubos. Os miotubos são multinucleados e seus núcleos centrais encontram-se enfileirados. Os primeiros miotubos, provenientes da fusão dos mioblastos são chamados de miotubos primários, e os que se formam posteriormente são denominados miotubos secundários.

Com o desenvolvimento progressivo, e a síntese das proteínas contráteis, há um aumento dos filamentos de actina e miosina, síntese de novas proteínas, organização dos miofilamentos em miofibrilas, aumento do número de mitocôndrias, aparecimento do sistema rudimentar de túbulos-T (derivado de invaginações da membrana plasmática),

diferenciação do retículo sarcoplasmático a partir do envoltório nuclear externo e, desenvolvimento da membrana basal. Com o passar do tempo, os miotubos aumentam de tamanho, são formados mais miofilamentos e ambos os sistemas de túbulos-T e do retículo sarcoplasmático começam a se diferenciar. Neste mesmo tempo, os núcleos se movem ao longo do citoesqueleto do centro da célula posicionando-se abaixo do sarcolema. Neste estágio o miotubo está completo e pronto para se diferenciar em uma fibra muscular esquelética (LIEBER, 1992; HAUSCHKA, 1994; MCCOMAS, 1996).

3.1.3. Sinaptogênese

Por sinaptogênese compreende-se a formação da junção neuromuscular (JNM).

A junção neuromuscular (ou placa terminal motora) é uma verdadeira sinapse, uma vez que usa um neurotransmissor químico, a acetilcolina (ACh), para transferir informações do nervo (região pré-sináptica) para o músculo (região pós-sináptica) através da fenda sináptica. A JNM é uma sinapse química, colinérgica, e a ACh está intimamente envolvida no processo contrátil.

Todas as junções neuromusculares adultas são compostas por cinco componentes principais: 1. Célula de Schwann, que forma uma cobertura acima da região do terminal nervoso, em geral através de seus prolongamentos citoplasmáticos; 2. Terminal nervoso, que contém o neurotransmissor; 3. Espaço ou fenda sináptica, situado entre as membranas pré- e pós-sináptica; 4. Sarcoplasma juncional, que se apresenta sob a forma de dobras juncionais e proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica; e 5. Membrana pós-sináptica, que contém os receptores colinérgicos.

Os receptores colinérgicos são proteínas específicas que estão integradas no sarcolema juncional. Quando as fibras nervosas contatam a fibra muscular na sinaptogênese, os receptores de ACh começam a concentrar-se em torno do sítio de contato do axônio, por um mecanismo ainda não bem conhecido. De qualquer forma o contato do axônio com a fibra muscular provoca a diminuição dos receptores de ACh extrajuncionais e aumenta os receptores juncionais.

Na JNM adulta, a desnervação resulta na reversão deste processo, isto é, há aumento dos receptores extrajuncionais. A estimulação elétrica após desnervação, pode

diminuir o número de receptores de ACh extrajuncionais. Assim que a JNM é formada, a fibra muscular perde sua receptividade para a formação de JNM em outros locais da fibra muscular. Após a formação inicial da JNM, vários outros motoneurônios formam sinapses. O número real de motoneurônios por sinapse varia de dois a seis, dependendo do músculo, e começa a declinar logo após o nascimento, de forma que na maturidade, todas as fibras musculares em mamíferos possuem apenas um único motoneurônio. Esta diminuição é altamente específica e o processo pelo qual ela acontece é denominado eliminação sináptica (para revisão ver: LIEBER, 1992; ENGEL, 1994; MCCOMAS, 1996).

3.1.4. Eliminação de Sinapses

A razão pela qual as fibras musculares são inicialmente hiperinervadas não é clara. A primeira sugestão que foi feita sobre a razão da ocorrência de hiperinervação seguida pela eliminação sináptica, é que esta seria um mecanismo de correção de junções neuromusculares que apresentassem “defeitos de fabricação” durante o crescimento axonal. Entretanto, sabe-se que o crescimento axonal é um processo bem definido, no qual a chance de erros é praticamente nula. Assim, a explicação precisa para a ocorrência de eliminação sináptica ainda não está clara. Também não se sabe quais seriam os fatores que determinariam qual o motoneurônio que permanecerá ao final do processo de eliminação sináptica. Se por um lado ainda não está claro como este evento mecânico é traduzido pela fibra muscular, por outro lado, já se sabe que os eventos mecânicos influenciam fortemente a maquinaria da célula muscular e o seu desenvolvimento. Isso desencadeia outro sistema de *feedback* positivo no qual o movimento, ou a ação mecânica aumenta a diferenciação, que por sua vez possibilita o movimento, que por sua vez aumenta a diferenciação, e assim por diante.

A plasticidade sináptica é evidenciada através: 1. do aparecimento e desaparecimento de *inputs* poliaxonais durante o desenvolvimento da JNM; 2. das transformações que ocorrem na estrutura fina e arquitetura molecular do terminal nervoso, na lâmina basal e da região pós-sináptica ao longo do desenvolvimento e durante os processos de regeneração da JNM; 3. do aparecimento de brotamentos

nervosos colaterais, ultraterminais e intraterminais em resposta a vários estímulos; 4. da remodelação da JNM durante a vida e com a idade (cf. ENGEL, 1994).

A remoção de inervação poliaxonal (ENGEL, 1994) ou eliminação de sinapses (LIEBER, 1992) ocorre geralmente quando axônios provenientes de segmentos inadequados da medula espinhal são removidos. A morte do motoneurônio acompanha a remoção de projeções incorretas no *pool* de motoneurônios, e a perda da inervação poliaxonal de locais sinápticos acompanha a morte do motoneurônio. Portanto, a perda da inervação axonal pode resultar da eliminação dos brotamentos colaterais, bem como da morte celular do motoneurônio.

As alterações pelas quais esses fenômenos biológicos passam atestam a plasticidade muscular, que pode ocorrer durante o desenvolvimento, e como veremos adiante, no adulto sob influência de variados estímulos ou fatores.

3.2. A Fibra Muscular Esquelética

Músculos estriados esqueléticos são especializados na geração rápida de movimento e de força numa direção específica. Sua estrutura altamente ordenada, tanto ao nível molecular, quanto microscopicamente, reflete esta função.

As fibras musculares estriadas são multinucleadas, possuem de 10 a 100 μm de diâmetro, podendo atingir variável comprimento. Ao microscópio de luz, as fibras estriadas mostram um modelo regular de faixas transversais. As fibras são compostas por numerosas miofibrilas, com 1 a 3 μm de diâmetro, cada qual envolta pelo retículo sarcoplasmático e dispostas paralelamente ao eixo da fibra. As miofibrilas são estriadas e são elas que conferem a aparência estriada à fibra muscular como um todo. A estriação decorre da disposição altamente ordenada, em registro, das proteínas estruturais, contráteis, ao longo do comprimento das miofibrilas.

O modelo de estriação da miofibrila se repete com a periodicidade de 2 a 3 μm . A unidade que se repete é conhecida como sarcômero, que pode ser considerado a unidade contrátil fundamental do músculo estriado. O sarcômero é margeado em cada extremidade por uma linha escura e estreita, conhecida como linha Z. Cada linha Z divide uma banda clara de 1 μm de extensão, chamada banda I, que é isotrópica à luz

polarizada. No centro do sarcômero há uma banda escura de 1,6 μm de extensão, anisotrópica à luz polarizada, denominada banda A, e que é dividida por uma zona menos densa, a zona H (ou banda H). No meio da zona H, existe uma região de alta densidade, chamada de linha M, local onde se concentram moléculas da enzima creatino quinase (*cf.* CRAIG, 1994).

O padrão de bandas é explicado pelo arranjo precisamente ordenado dos filamentos contráteis dentro da miofibrila, sendo a banda I formada somente por filamentos finos, a banda A, por filamentos grossos interpostos regular e equidistantemente com filamentos finos e a zona H somente por filamentos grossos. Os filamentos grossos e finos são polímeros formados por proteínas que não estão ligadas covalentemente, e são chamados de filamentos contráteis. A miosina é o maior constituinte dos filamentos grossos, enquanto a actina representa a maior parte dos constituintes dos filamentos finos. Os filamentos grossos também apresentam outras proteínas, em menor quantidade que a miosina, estes incluem proteína C, proteína H, proteína X, AMP deaminase, miomesina, proteína M e creatino-quinase. Os filamentos grossos também estão associados, ao longo de sua extensão, à proteína gigante titina. Além da actina, os miofilamentos finos apresentam outras proteínas, as mais importantes são a tropomiosina e a troponina (que formam um complexo envolvido na regulação da contração), a nebulina (uma segunda proteína miofibrilar gigante) e a α -actinina. Os filamentos finos auxiliam na formação do citoesqueleto das fibras musculares (para revisão ver: CRAIG, 1994; MCCOMAS, 1996).

Outra proteína de cabal importância é a distrofina. A distrofina é uma proteína membro da família das espectrinas (DAVISON e CRITCHLEY, 1988) e está organizada em quatro domínios estruturais: um domínio amino-terminal ligado à actina, um domínio central, um domínio rico em cisteína e um domínio carboxi-terminal (KOENIG e KUNKEL, 1990; COFFEY *et al.*, 1992). A função precisa da distrofina ainda é desconhecida, originalmente a distrofina foi relacionada com a estabilidade da membrana muscular. Na falta da distrofina, a membrana se desestabiliza e aumenta a entrada de cálcio na fibra, levando à mionecrose e degeneração muscular (BERTORINI *et al.*, 1982). A distrofina está ancorada ao sarcolema através de um complexo

glicoproteico denominado complexo distrofina-glicoproteína, que está organizado em um grupo de proteínas complexas que inclui a actina, a distroglicana, as sintrofinas, distrobrevinas e as sarcoglicanas (RANDO, 2001; BIGGAN *et al.*, 2002; LAPIDOS *et al.*, 2004).

3.2.1. Tipos de Fibras Musculares Esqueléticas

A heterogeneidade do músculo esquelético é principalmente evidente quando se observa a sua organização celular; através dela é possível constatar que o músculo de mamíferos, e em especial o humano, é composto por uma população heterogênea de tipos de fibras musculares. Esta população de tipos de fibras constitui a base da variedade e qualidade das funções que o músculo pode desempenhar. Além disso, as fibras musculares podem adaptar-se a alterações de demanda, alterando seu tamanho ou a composição de suas fibras. Esta plasticidade serve como base fisiológica para as numerosas intervenções de fisioterapia destinadas a aumentar o desenvolvimento da força e da sustentação do paciente. Alterações na composição do tipo de fibra de um músculo também podem ser responsáveis por algumas das alterações ou disfunções vistas em pacientes que ficaram sujeitos a grandes períodos de imobilidade, inatividade, ou desnervação do músculo.

Nas últimas décadas, o número de técnicas disponíveis para classificação das fibras musculares aumentou, resultando em vários sistemas de classificação, dependendo das propriedades analisadas (PETTE e STARON, 1997).

A classificação das fibras musculares pode ser feita usando-se técnicas histoquímicas, bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas, contudo as classificações das fibras musculares por diferentes técnicas nem sempre são concordantes.

A diversidade das fibras musculares esqueléticas é decorrente e pode ser demonstrada de acordo com as suas propriedades contráteis e metabólicas. Três grupos de fibras diferem quanto aos seus tempos de contração isométrica sendo classificadas como fibras de contração: rápida (*fast*), intermediária (*intermediate*) e lenta (*slow*) (CLOSE, 1967; EDSTRÖM e KUGELBERG, 1968; KUGELBERG, 1973). Estes três tipos foram complementados fazendo uso de experimentos que se baseavam nas

propriedades de fadiga da fibra muscular, resultando na delineação de: *fast-fatigable* (fibras de contração rápida fatigáveis), *fast-fatigue resistant* (fibras de contração rápida, fatigáveis resistentes) e *slow-fatigue resistant* (fibras de contração lenta fatigáveis) (BURKE *et al.*, 1971). Esta classificação funcional mostra correlação com os três tipos de fibras classificados histoquimicamente: *fast-twitch glycolytic* (FG) cujo metabolismo é glicolítico, *fast-twitch glycolytic-oxidative* (FOG), de metabolismo glicolítico-oxidativo e *slow-twitch oxidative* (SO), de metabolismo oxidativo (BARNARD *et al.*, 1971; PETER *et al.*, 1972).

3.2.2. Desenvolvimento de Tipos de Fibras Musculares

A geração (formação) de miofibras especializadas, originadas de células progenitoras especializadas, e a organização de esquemas precisos da inervação motora, são questões centrais da biologia do tecido muscular. O tipo de axônio motor é que definirá o fenotipo da fibra muscular. Na maioria dos músculos, fibras rápidas e lentas estão misturadas entre si, formando um mosaico. Uma implicação deste arranjo é que as unidades motoras estão misturadas. Todas as miofibras dentro de uma unidade motora possuem as mesmas propriedades contráteis e metabólicas (BURKE *et al.*, 1973; KUGELBERG, 1973; NEMETH *et al.*, 1985). Estas características sustentam a hipótese de que as fibras musculares têm suas propriedades determinadas pelo motoneurônio. A transformação das propriedades de um determinado tipo de fibra muscular, por exemplo de uma fibra de contração lenta para uma fibra de contração rápida, é comprovada por experimentos de inervação cruzada, onde a fibra receptora passa a exibir o fenótipo da fibra original a que pertencia o axônio motor transplantado. Geralmente, o sistema nervoso central também instrui a diferenciação dos tipos de fibra muscular que ocorre durante a miogênese ao longo do desenvolvimento (KELLY e RUBINSTEIN, 1994). Nos estágios iniciais do desenvolvimento do músculo esquelético de aves, tanto a formação das fibras musculares primárias como a diversidade das fibras são processos independentes de inervação. Já a formação das fibras musculares secundárias e o crescimento das fibras primárias e secundárias são processos dependentes de inervação (STOCKDALE e MILLER, 1987).

3.2.3. ATPase miofibrilar (mATPase)

A ATPase miofibrilar (m-ATPase) é uma técnica histoquímica amplamente utilizada no reconhecimento dos tipos de fibras e está relacionada com a velocidade de contração muscular dependente de ATP. Fazendo uso dessa técnica, quatro grupos maiores de tipos de fibras foram delineados, sendo três deles de fibras rápidas, tipo II (*fast*) e um de fibras lentas, tipo I (*slow*) (PETTE e STARON, 1990, 1993; SCHIAFFINO e REGGIANI, 1994). Os subtipos IIB, IID/X e IIA contêm a isoforma correspondente de cadeia pesada de miosina (*myosin heavy chain*), MHC-IIB, MHC-IId/x e MHC-IIa, enquanto o tipo I contém a isoforma MHC-I. Estes quatro tipos representam populações distintas expressando somente uma isoforma de MHC e são consideradas fibras puras (STARON e PETTE, 1987a,b; STARON *et al.*, 1987). Fibras que contêm duas isoformas de miosina combinadas, como por exemplo, MHC-IIB + MHC-IId/x, MHC-IId/x + MHC-IIa ou MHC-IIa + MHC-I, são consideradas fibras híbridas ou de transição (PIEROBON-BORMIOLI *et al.*, 1981; STARON e PETTE, 1986). Pela combinação das técnicas de histoquímica de ATPase miofibrilar (m-ATPase) com a análise bioquímica dos tipos de MHC em fibras musculares isoladas (*single fiber analysis*) é possível delinear histoquimicamente estes tipos de fibras híbridas ou de transição (STARON e PETTE, 1986; TERMIN *et al.*, 1989; STARON, 1991; HÄMÄLÄINEN e PETTE, 1993; PEREIRA *et al.*, 1995).

Os diferentes tipos de fibras musculares também podem ser distinguidos por meio de reações histoquímicas para enzimas cujo metabolismo é oxidativo e aeróbico, por exemplo, succinato desidrogenase (SDH), citocromo oxidase, e nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogênio tetrazólio redutase (NADH-TR) (PETTE e STARON, 1990).

3.3. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO), é uma molécula gasosa, liberada como co-produto do metabolismo do aminoácido L-arginina para L-citrulina, através de uma reação catalizada por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). A biossíntese de NO já foi relatada em diversos tipos de células endoteliais, miócitos, neurônios, macrófagos,

monócitos, neutrófilos, plaquetas e hepatócitos, entre outros (MONCADA *et al.*, 1991; NATHAN, 1992; FUKUTO e CHAUDHURI, 1995).

O NO exerce amplo espectro de atividades biológicas *in vivo*, inclusive na apoptose, citotoxicidade (DRAPIER e HIBBS, 1988; BECKMAN e KOPPENOL, 1996; BRÜNE *et al.*, 1998 a,b), inflamação, dor (CATTELL e JANSEN, 1994), neurotransmissão e no tônus vascular (FLEMING *et al.*, 1996). No sistema cardiovascular, o NO possui potente ação vasodilatadora e é responsável por pelo menos parte da resposta hipotensora à acetilcolina e a peptídeos como a bradicinina. Muitos efeitos do NO são mediados principalmente pela guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico (cGMP), produzida após estimulação da enzima guanilil ciclase solúvel pelo próprio NO (MONCADA *et al.*, 1991). Além disso, a interação de NO com intermediários reativos de oxigênio pode ter um papel importante na modulação de respostas vasculares (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; WOLIN *et al.*, 1998).

O NO exerce várias funções independentes das mediadas pelo cGMP. Tais funções incluem a modulação da síntese protéica (CURRAN *et al.*, 1991), controle de atividade enzimática (TROY *et al.*, 1996) e a regulação da expressão (ativação ou repressão) de genes para α -actina (KAWADA *et al.*, 1996), citocinas (REMICK e VILLARETE, 1996), fatores de crescimento (TSURUMI *et al.*, 1997; GUO *et al.*, 1998), moléculas de adesão (BIFFL *et al.*, 1996; LEFER, 1996; MUROHARA *et al.*, 1996; KUPATT *et al.*, 1997), proteínas envolvidas em apoptose (BRÜNE *et al.*, 1998a,b), receptores (MICHELSON *et al.*, 1996; REMOND *et al.*, 1996; WALLACE e BOOZE, 1997; ICHIKI *et al.*, 1998; USUI *et al.*, 1998), e enzimas, tais como a ciclooxigenase-2 (COX-2) (AMIN *et al.*, 1997), citocromos P-450 (KHATSENKO, 1998), metaloprotease de matriz extracelular (LALA e ORUCEVIC, 1998), superóxido dismutase (BRADY *et al.*, 1997) e a própria modulação da atividade da NOS (CHEN e MEHTA, 1997).

Substâncias análogas à L-arginina, tais como a L-nitro-arginina (L-NA) (ISHII *et al.*, 1990; MAGGI *et al.*, 1991), N^ω-amino-L-arginina (L-NAA), N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (MOORE *et al.*, 1990), N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) e N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) (MARLETTA *et al.*, 1988) inibem a atividade de

NOS, tanto *in vitro* como *in vivo*, embora existam diferenças na especificidade e potência (FUKUTO e CHAUDHURI, 1995). Os isômeros L são inibidores mais efetivos da NOS do que os isômeros D correspondentes (MONCADA *et al.*, 1997). Entre os inibidores disponíveis, o L-NMMA e o L-NAME são ativos por via oral. Outros compostos não derivados da L-arginina, tais como guanidina, imidazóis, 7-nitroindazóis e azul de metileno (SOUTHAN e SZABÓ, 1960), também têm sido descritos como inibidores da NOS. Neste grupo existem compostos “seletivos” para a NOS, como é o caso da aminoguanidina que inibe preferencialmente a iNOS (CORBETT *et al.*, 1992) e o 7-nitroindazol que inibe preferencialmente a nNOS (MOORE *et al.*, 1993). Através do uso de inibidores de NOS tem sido possível estudar o papel do NO endógeno em diversos eventos fisiopatológicos. Dentre os inibidores de NOS, destaca-se o L-NAME, um inibidor amplamente usado devido à potente ação inibidora não-específica sobre a NOS.

A administração aguda de L-NAME em diversas espécies animais resulta em hipertensão arterial acompanhada por aumento de resistência vascular sistêmica, bradicardia e redução do débito cardíaco (GARDINER *et al.*, 1990; RICHARD *et al.*, 1991; KLABUNDE *et al.*, 1991; VAN GELDEREN *et al.*, 1993; ZAPPELLINI *et al.*, 1997), efeitos estes que podem ser revertidos pela administração de L-arginina (REES *et al.*, 1988). De forma semelhante, ratos tratados cronicamente com L-NAME (20 mg/kg/dia) durante até oito semanas desenvolvem hipertensão prolongada (ARNAL *et al.*, 1992; BAYLIS *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1992). As alterações hemodinâmicas e morfológicas associadas a este modelo de hipertensão têm sido muito estudadas, principalmente nos tecidos cardíaco (MORENO Jr. *et al.*, 1995, 1997) e renal (ZATZ e BAYLIS, 1998). No rim e coração, a inibição crônica afeta não somente as propriedades vasculares destes dois órgãos, mas também resulta em dano tecidual com necrose seguido de fibrose. Doses menores de L-NAME (7.5 mg/kg/dia) também são eficazes em inibir a atividade da NOS e causar hipertensão, porém sem produzir dano morfológico intenso (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

3.3.1. Óxido Nítrico Sintases

Pelo menos três tipos de NOS são reconhecidos: NOS neuronal (nNOS ou NOS I), NOS endotelial (eNOS ou NOS III) e NOS induzível (iNOS ou NOS II) (TAYLOR *et al.*, 1998). Os três tipos de isoformas foram nomeados de acordo com a célula ou tecido no qual foram originariamente encontradas, ou de acordo com a ordem histórica na qual foram purificadas e clonadas (GROZDANOVIC, 2001).

A nNOS e a eNOS são enzimas de expressão constitutiva, cuja atividade depende do complexo Ca^{2+} /calmodulina, enquanto a iNOS é uma isoforma induzível por citocinas e endotoxinas bacterianas e cuja atividade independe de Ca^{2+} (FUKUTO e CHAUDHURI, 1995). Entretanto, têm sido ultimamente postulado, que os três tipos de NOS podem ser consideradas constitutivas, uma vez que a iNOS já foi identificada em tecidos normais, em condições fisiológicas (PUNKT *et al.*, 2002). Outra corrente afirma que todos os três tipos de NOS podem ser também considerados induzíveis, já que sob condições específicas podem aumentar sua expressão e atividade (GROZDANOVIC, 2001). A nNOS e eNOS liberam baixos níveis de NO por períodos curtos, enquanto a iNOS produz altos níveis de NO por períodos prolongados de tempo (MONCADA *et al.*, 1991).

Todas as isoformas de NOS podem ser reguladas por transcrição, através de hipóxia. Por exemplo, a expressão da nNOS é aumentada pela lesão por esmagamento (RUBISTEIN *et al.*, 1998), atividade muscular (BALON e NADLER, 1997), e processos de envelhecimento (CAPANNI *et al.*, 1998), ao mesmo tempo decresce após a desnervação (TEWS *et al.*, 1997). Tanto a eNOS vascular, como a eNOS da musculatura esquelética, são reguladas pelo exercício crônico (estimulação) (BALON e NADLER, 1997; TIDBALL *et al.*, 1998). O início da expressão da nNOS muscular e da iNOS coincide com a fusão dos miotubos em cultura (KALIMAN *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1994), sugerindo que a expressão é regulada pelo desenvolvimento.

3.3.2. O Óxido Nítrico no Músculo Esquelético

No músculo esquelético, o NO está envolvido na regulação da contratilidade, metabolismo mitocondrial, homeostasia da glicose, e fluxo sanguíneo

(GROZDANOVIC e BAUMGARTEN, 1999; REID, 1998; STAMLER e MEISSNER, 2001).

A atividade da NOS é visível na inibição da respiração mitocondrial no músculo esquelético (KING *et al.*, 1994 e KOBZIK *et al.*, 1995). O tratamento de músculos com doadores de NO pode inibir a atividade da ATPase sobre o complexo actomiosina e com isso, reduzir a força no músculo esquelético (PERKINS *et al.*, 1997).

No tecido muscular esquelético a isoforma neuronal da NOS está associada ao sarcolema das células musculares, onde estabelece relação direta com as proteínas do citoesqueleto, como a distrofina e as integrinas e, é particularmente abundante nos locais de contato músculo-tendão (KOBZIK *et al.*, 1995, CHANG *et al.*, 1996, GOSSRAU, 1998). Por outro lado, a atividade da nNOS aumenta em decorrência de atividade mecânica (TIDBALL *et al.*, 1998) e induz a adição de novos sarcômeros às fibras musculares, o que é importante na função e desenvolvimento do músculo normal, como também é necessária no crescimento em comprimento longitudinal do músculo, além de influenciar positivamente as propriedades de força e velocidade e de força e comprimento do mesmo (KOH e TIDBALL, 1999).

A isoforma neuronal (nNOS) é detectada em vários músculos esqueléticos, tanto em humanos, como em ratos, camundongos e outras espécies (STAMLER e MEISSNER, 2001).

A eNOS ou isoforma endotelial também está presente no músculo esquelético onde está associada com mitocôndrias (KOBZIK *et al.*, 1995, OHKOSHI *et al.*, 1997); é uma proteína periférica de membrana, duplamente acilada, que tem como alvo a cavéola plasmática endotelial, através de interação com a caveolina-1, uma proteína estrutural da cavéola (GARCIA *et al.*, 1997) e da cavéola sarcolemal, no coração, através de interação similar com a caveolina-3 (FERON *et al.*, 1998).

Em músculos esqueléticos de roedores a isoforma endotelial está distribuída de forma homogênea entre as fibras de contração rápida e lenta e associada com mitocôndrias (KOBZIK *et al.*, 1995), também está relacionada com a respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (REID, 1998). Em músculos de humanos, a eNOS é encontrada tanto no endotélio dos grandes vasos como no endotélio dos pequenos e

micro vasos (FRANDSEN *et al.*,1996). Estudos imunohistoquímicos detectaram a presença da eNOS no endotélio e no tecido perivascular de artérias coronárias (TAMBASCIA *et al.*,2001).

A eNOS é um importante vasodilatador e também inibe a adesão e agregação plaquetária (GROZDANOVIC, 2001).

A atividade da isoforma induzível (iNOS) varia nos músculos esqueléticos, dependendo do estágio da doença ou espécies animais investigadas. A expressão da iNOS torna-se grandemente aumentada em células musculares esqueléticas de pacientes com falência cardíaca crônica (ADAMS *et al.*, 1999; RIEDE *et al.*, 1998), ou com miopatias inflamatórias autoimunes (TEWS e GOEBEL, 1992), e em animais ou cultura de células musculares esqueléticas, após exposição ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), ou à citocinas inflamatórias (BOCZKOWSKI *et al.*, 1996; EL-DWAIRI *et al.*, 1998).

3.4. OBJETIVOS

Através dessa breve introdução procurou-se oferecer um breve quadro do tecido muscular esquelético, no que se refere a aspectos do seu desenvolvimento, da sua estrutura e plasticidade. Foram apresentados sucintamente, os diferentes tipos de fibras musculares que constituem um músculo, bem como foram apontados alguns dos critérios que são usados para a classificação das fibras musculares. Procurou-se também situar o papel do óxido nítrico na fisiologia muscular, e fornecer um breve relato acerca das três isoformas da óxido nítrico sintase, todas elas expressas no tecido muscular esquelético. O crescente interesse despertado pelo papel do óxido nítrico, como mensageiro modulador em diferentes processos biológicos, e a constatação de que o músculo esquelético é uma das maiores fontes desse gás, foi um ponto importante que serviu de base para a presente pesquisa.

Tendo em vista que o tecido muscular mostra uma admirável capacidade plástica de responder a estímulos alterando seu perfil fenotípico, o objetivo do presente trabalho foi investigar se o tratamento crônico com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) em ratos, afeta a proporção de tipos de fibras musculares nos músculos *soleus*, um músculo predominantemente composto de fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo, e no *extensor digitorum longus*, um músculo predominantemente composto de fibras de contração rápida e metabolismo glicolítico. A área da secção transversal das fibras e a contagem do número de núcleos, como parâmetros de hipertrofia do tecido, a determinação da expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina de ambos os músculos, e a expressão das óxido nítrico sintases neuronal (n-NOS ou NOS tipo I) e endotelial (e-NOS ou NOS tipo III), tanto por western blotting como por imunohistoquímica, foram também investigadas.

4. ARTIGO 1

Histochemical analysis of *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles from rats treated chronically with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

Histochemical analysis of *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles from rats treated chronically with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

Ito, A.C.¹, Leonardo, M.B.¹, Delatorre, M.C.¹, Medeiros, M.V.³,
Campos, G.E.R.², Hyslop, S.³, Cruz-Höfling, M.A.¹

¹Departamento de Histologia e Embriologia, and ²Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, ³Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Running title: NO and skeletal muscle fiber types

*Author for correspondence: Maria Alice da Cruz-Höfling, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel./Fax 55-19-3788-6247. E-mail: hofling@unicamp.br

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) plays an important role in numerous physiological processes, including muscle contraction and metabolism. In this work, we used the histochemical mATPase technique and electrophoresis of muscle extracts to investigate whether the chronic inhibition of NO synthesis affected the composition and cross-sectional areas of fibers in *soleus* (SOL), a predominantly slow-twitch oxidative muscle, and *extensor digitorum longus* (EDL), a predominantly fast-twitch glycolytic muscle, as well as the expression of slow and fast myosin isoforms. Treatment with L-NAME did not significantly alter the percentage of muscle fiber types, except for a slight, but significant decrease in type I fibers of SOL in rats treated with L-NAME for two weeks. Similarly, the muscle fiber cross-sectional areas were unaffected, except for hypertrophy of type IID fibers in SOL from rats treated with L-NAME for eight weeks. There were also no significant changes in the expression of myosin isoforms in SOL and EDL. These results show that the chronic inhibition of NOS activity does not affect the fiber type and cross-sectional area, or the expression of myosin isoforms, in rat SOL and EDL muscles, except for type I and IID fibers in *soleus* muscle.

Key words: Chronic inhibition, L-NAME, Muscle fiber type, Myosin, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Rat hindlimb muscle

INTRODUCTION

Myosin consists of two myosin heavy chains (MHC) and two pairs of myosin light chains. The distal ends of the MHCs have ATP-binding sites, ATPase activity, and can bind actin to promote muscle contraction. The expression of myosin isoforms has been correlated with fibers classified as slow- or fast-contracting based on the m-ATPase histochemical technique (Talmadge and Roy, 1993; Schiaffino and Reggiani, 1994). Slow- and fast-twitch fibers have been identified in skeletal muscle of different species of vertebrates (Staron and Pette, 1986; Termin *et al.*, 1989; Staron, 1991; Arguello *et al.*, 2001). Slow fibers express the myosin type I isoform (MHCI) (Talmadge *et al.*, 2002), whereas fast fibers express three fast myosin isoforms (IIa, IIb, IId), and the respective MHC-containing fibers are of the type IIA, IIB or IID (Termin *et al.*, 1989), with the latter fiber type also being referred to as IIX (MHCIIx isoform) (Pette and Staron, 1990; Schiaffino and Reggiani, 1994, 1996).

The selective expression of each of these isoforms in a muscle fiber results in four different types of fibers. Pure fibers express only one myosin isoform whereas hybrid fibers express two or more myosin isoforms (Pette and Staron, 1993). Based on the combination of myosin expressed in a given fiber, the following subtypes can be distinguished: IC (MHC I > MHC IIa), IIC (MHC IIa > MHC I), IIAD (MHC IIa > MHC IIId), IIDA (MHC IIId > MHC IIa), IIDB (MHC IIId > MHC IIb) and IIBD (MHC IIb > MHC IIId) (Pette and Staron, 1993). The existence of different fiber types in the same muscle allows the muscle to alter its energetic and myofibrillar phenotype in response to stimuli. This adaptation frequently involves modulation of the expression of myosin isoforms and other muscle genes (Pette and Vrbová, 1992).

Recent studies have shown that skeletal muscle is a major source of nitric oxide (NO) (Maréchal and Gailly, 1999) and expresses all three isoforms of nitric oxide synthase (NOS), namely, neuronal, endothelial and inducible NOS (nNOS or NOS type I, eNOS or NOS type III, and iNOS or NOS type II, respectively) (Stamler and Meissner, 2001). In muscle, NO has a variety of actions that include the regulation of cell growth (Sheehy *et al.*, 1997), differentiation (Kaliman *et al.*, 1999), migration (Mason *et al.*, 1999), and apoptosis (Kobzik *et al.*, 1994). Both eNOS and nNOS are upregulated in skeletal muscle after exercise training (Balon and Nadler, 1997; Perez *et al.*, 2002; Vassilakopoulos *et al.*, 2003) and electrical stimulation (Reiser *et al.*, 1997; Folland *et al.*, 2000), and downregulated during muscle disuse or immobilization (Rudnick *et al.*, 2004). Furthermore, changes in NOS expression and activity may increase talin and vinculin levels and decrease calpain-mediated talin proteolysis, thereby modulating the mechanical behavior of skeletal muscle myocytes (Tidball *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

In this work, we used m-ATPase activity-based fiber typing and the fiber cross-sectional area to assess the influence of chronic treatment with the non-selective NOS inhibitor N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the proportion of muscle fiber types in *soleus* (SOL), a predominantly slow-contracting muscle, and *extensor digitorum longus* (EDL), a predominantly fast-contracting glycolytic muscle, in rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty male Wistar rats (150 g at the start of the experiment) were obtained from the Central Animal House of the State University of Campinas. The rats were housed in standard plastic cages at a constant temperature of 25°C with free access to food and water. The experiments described here were done within the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Treatment with L-NAME

The rats received L-NAME (20 mg/rat/day) in the drinking water for two, four and eight weeks (n=5 rats/period) (Ribeiro *et al.*, 1992). Control rats received tap water. Systemic arterial blood pressure was measured by a tail-cuff method in conscious rats (Zatz, 1990). Blood pressure was measured before treatment and then at weekly intervals throughout the experiment. The treatment with L-NAME was efficacious since the blood pressure in all treated groups was significantly greater than the corresponding controls: 2 weeks – Control 121 ± 7 vs. L-NAME $170 \pm 11^*$; 4 weeks – Control 130 ± 9 vs. L-NAME $173 \pm 15^*$; 8 weeks – Control 125 ± 11 vs. L-NAME $178 \pm 12^*$.

Fiber typing and determination of cross-sectional area

Frozen muscles (SOL and EDL) were placed in a cryostat at -24°C for 1 h before processing. The midportion of the SOL and EDL was cut into 12- μ m-thick sections and the main fiber types and subtypes were determined using the mATPase technique (Staron and Pette, 1993) after pre-incubation at pH 4.25 and pH 4.55 for SOL and pH 4.35 and pH 4.55 for EDL (Brooke and Kaiser, 1970), as well as pH 10.5 for SOL and pH 10.6 for EDL (Guth and Samaha, 1970). The sections pre-incubated at the acidic and alkaline pHs were examined to determine the number, percentage and cross-sectional areas of the different fiber types. For SOL, the fiber subtypes determined were I and IC (grouped as I), IIC, IIA and IIAD (grouped as IIA), and IIDA and IID (grouped as IID). For EDL, the fiber subtypes determined were I, IC, IIC plus half the number of IIAC (grouped as I), half of IIAC, IIA and IIAD (grouped as IIA), IIDA, IID and IIDB (grouped as IID), and IIBD and IIB (grouped as IIB). Five regions of each muscle section containing approximately 50 fibers each were selected at random (total of ~250 fibers per rat), captured on computer using a CCD camera coupled to a light microscope and counted (Image Pro-Plus 4.1, Media Cybernetics). Since each experimental group consisted of n=5 rats, a total of 750 fibers per group was analyzed, from which the number of type I, IIA, IID and IIB fibers was determined. In addition, the fiber cross-sectional area (μm^2) was measured.

Myosin heavy chain (MHC) analysis

After sections had been collected for histochemistry, 5–15 additional sections (12 μ m thick) were collected for biochemical analysis. The sections were placed in 0.5 ml of a solution containing 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β -mercaptoethanol and 2.3% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) in 62.5 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8. The mixture was then shaken (1 min) and heated (10 min) to 60°C. Small portions of the extract (6 μ l) were then run on 7–10% gradient polyacrylamide gels for 20 h at 120 V and stained with 2% AgNO₃ in 40% formol (Blum *et al.*, 1987). Myosin heavy chains were identified according to their apparent molecular masses compared with those of marker proteins. The gels were scanned with an HP Scan Jet 6100C/T scanner and the percentage of each myosin isoform was determined indirectly using Scion Image software.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SD, where appropriate. The densitometric values of the reactive bands and the percentage and cross-sectional areas of the fiber types were analyzed using the GraphPad Prism software package. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was used to compare the treated and control groups. A value of $p < 0.05$ indicated significance.

RESULTS

Fiber type distribution

Figure 1 shows the three main fiber subtypes defined as described in the Methods. SOL muscle consisted predominantly of slow-twitch type I fibers, with a small percentage of type IIA and IID fibers (Fig. 1A-C). In contrast, EDL muscle had predominantly fast-twitch type IID and IIB fibers and a minor percentage of type I and IIA fibers (Fig. 1D-F).

After two weeks, there was a slight (13.2%) but significant ($p < 0.05$) decrease in the percentage of type I fibers in SOL of L-NAME-treated rats compared to the controls SOL, but this difference was not seen after four and eight weeks. There was an increase in type IIA fibers of SOL after two weeks of treatment with L-NAME, but this increase was not significant; there was no change in these fibers after four and eight weeks of treatment. There were no significant changes in the percentage of type IID fibers in any of the treatment intervals (Fig. 2A).

There were no significant changes in any of the fiber types in EDL muscle after up to eight weeks of treatment with L-NAME (Fig. 2B). However, compared to the fibers in SOL, there was greater variation in the percentage of each fiber type present, as shown by the greater distribution of the error bars.

Cross-sectional area

There were no significant differences in the cross-sectional areas of type I and IIA fibers of SOL muscle from control and L-NAME-treated rats. However, type IID fibers showed a significant increase in cross-sectional area after eight weeks of treatment compared to the corresponding controls (Fig. 3A). There were no significant changes in the cross-sectional areas of the fibers in EDL muscle in any of the L-NAME-treated groups compared to the corresponding controls (Fig. 3B).

MHC analysis

The SOL muscle showed the typical predominant expression of the MHC I isoform, followed by the MHC IIa isoform. The MHC IId isoform was not seen in the control or treated rats. In EDL muscle, the IIb isoform typically predominated over IId and IIa isoforms. Densitometric analysis showed that there were no significant changes in the expression of the the MHC isoforms of these two muscles (Fig. 4).

DISCUSSION

The expression of specific MHC isoforms in a given skeletal muscle fiber influences the fiber's contractile and histochemical characteristics. Changes in the phenotypic profile require the expression of MHC specific genes. Pette *et al.* (1999) described the various methods used to study myosin and the expression of MHC isoforms, including the histochemical analysis of ATPase activity to assess the globular portion of myosin and electrophoresis to evaluate the expression of myosin isoforms. Unlike phenotypic transitions triggered by changes in motor innervation, hormone levels, electrical stimulation, mechanical stimuli (exercise, overloading or unloading), disuse, partial or total immobilization, and aging (reviewed by Pette and Staron, 1997

and Talmadge, 2000), chronic treatment with L-NAME did not alter the phenotypic profile of muscle fiber types, except for fiber type I in SOL.

As shown here, chronic treatment with L-NAME produced a slight but significant decrease in the percentage of type I fibers in SOL after two weeks, and a significant increase in the cross-sectional area of the type IID fibers after eight weeks, but with no other significant changes in the other time intervals studied, or in relation to other fiber types of SOL and EDL. The treatment with L-NAME was efficacious since all treated rats developed hypertension (see Methods), indicating inhibition of NOS. Nevertheless, the expression of eNOS and nNOS, as assessed by western blotting and immunohistochemistry, was unchanged (Ito *et al.*, unpublished results).

These findings agree with a report by Smith *et al.* (2002) who studied the adaptation of muscle in rats to chronic overload, in the absence and presence of chronic treatment with L-NAME. These authors found no significant differences in the cross-sectional areas of muscle from unloaded groups in the absence and presence of L-NAME, in the MHC composition and in the percentage of type I, IIA and IIB/X fibers in *plantaris* muscle. Significant differences were seen only in rats submitted to overload plus L-NAME, with the parameters affected being the percentage of type I fibers, the expression of MHC I, IIA and IIB, and the cross-sectional areas of type I and IIB/X fibers. These authors concluded that NO signaling in skeletal muscle represented a mechanosensitive pathway for modulating muscle phenotype. The suggestion that NOS is a putative mechanosensor in skeletal muscle (Smith *et al.*, 2002) is supported by the observation that this tissue is one of the richest sources of NO in mammals (Kobzik *et al.*, 1994), with eNOS and nNOS being calcium-dependent and occurring at high levels (Morrison *et al.*, 1996; Stamler and Meissner, 2001). In addition, the expression of these enzymes may be modulated by exercise training (Balon and Nadler, 1997), electrical stimulation (Reiser *et al.*, 1997), and the degree of loading (Roberts *et al.*, 1999; Tidball *et al.*, 1998).

The chronic administration of L-NAME to rats reduces blood flow to muscle, presumably by inhibiting eNOS (Wilson and Kapoor, 1993; Hirai *et al.*, 1994; Hickner *et al.*, 1997). The decrease seen in type I fibers of SOL muscle after two weeks of

treatment with L-NAME may have reflected an initial response to a reduced blood flow since these fibers are slow-contracting fibers that depend on oxidative metabolism. An initial decrease in blood flow could have affected these fibers, causing slow-to-fast transition in the SOL muscle, whereas the lack of such an effect after four and eight weeks may indicate an adaptive response to the chronic absence of NO.

Chronic treatment with L-NAME also did not significantly alter the expression of the myosin isoforms or the cross-sectional areas of the different fiber types, except for type IID fibers, the cross-sectional area of which increased after eight weeks of treatment. IID fibers are usually very rare in SOL and represent only 3-5% of the total muscle fibers under normal conditions. The increase in the cross-sectional area of these fibers after eight weeks suggested that they were affected by NO deprivation, the explanation of which remains obscure. We speculate that since type IID fibers are fast fiber types they are target when NO synthesis is chronically blocked, because nNOS is enriched in fast muscle fibers where NO modulates the development of contractile force (Kobzik *et al.*, 1994). However, Smith *et al.*, (2002) failed to correlate NOS activity and skeletal muscle hypertrophy, unless chronic overload is combined with blockade of NOS activity. On the other hand, the reduced blood flow caused by the chronic treatment with L-NAME would not alter the percentage of the typical fiber types of EDL muscle, nor the cross sectional area of these fibers, because this muscle is genetically adapted to a glycolytic metabolism.

Together, these results indicate that the chronic inhibition of NO biosynthesis by L-NAME did not alter the fiber type, fiber cross-sectional area and myosin isoform expression in rat SOL and EDL muscles, except for type I fibers and type IID fibers in *soleus* muscle. That decline of blood flow caused by the deprivation of NO may explain the decrease of fibers type I is also supported by both the marked increased (72%, although not significant owing to individual variability) of fibers type IIA after two weeks treatment, and the tendency of increasing MHC- IIa in SOL after four and eight weeks. In agreement, MHC-I decreasing tendency after two weeks of L-NAME treatment gives support to such hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

A.C.I. was supported by a studentship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), M.V.M. was supported by a post-doctoral fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and M.C.D. was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M.A.C.H. and S.H. are also supported by research fellowships from CNPq. This work was partially supported by FAPESP (Proc. 98/06700-2, 96/11653-8) and CNPq (Proc. 477586-2003-1).

REFERENCES

- Arguello A, Lopez-Fernandez JL, Rivero JL. Limb myosin heavy chain isoproteins and muscle fiber types in the adult goat (*Capra hircus*). *Anat. Rec.* 264: 284-293, 2001.
- Balon TW, Nadler J. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 82: 359-363, 1997.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99, 1987.
- Brooke MH, Kaiser KK. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulphydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 670-672, 1970.
- Folland JP, Maas H, Jones DA. The influence of nitric oxide on in vivo human skeletal muscle properties. *Acta Physiol. Scand.* 169: 141-148, 2000.
- Guth L, Samaha FJ. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28: 365-367, 1970.
- Hickner RC, Fisher JS, Ehsani AA, Kohrt WM. Role of nitric oxide in skeletal muscle blood flow at rest and during dynamic exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 273: H405-H410, 1997.
- Hirai T, Visneski MD, Kearns KJ, Zelis R, Musch TI. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 77: 1288-1293, 1994.

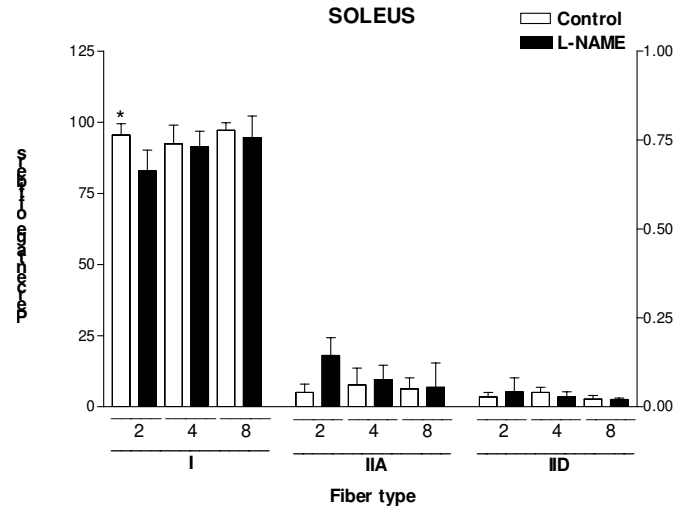
- Kaliman P, Canicio J, Testar X, Manuel P, Zorzano A. Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-B and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 17437–17444, 1999.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 346-348, 1994.
- Maréchal G, Gailly P. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1088-1102, 1999.
- Mason CA, Chang P, Fallery C, Rabinovitch M. Nitric oxide mediates LC-3-dependent regulation of fibronectin in ductus arteriosus intimal cushion formation. *FASEB J.* 13: 1423-1434, 1999.
- Morrison RJ, Miller CC III, Reid MB. Nitric oxide effects on shortening velocity and power production in the rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* 80: 1065-1069, 1996.
- Perez AC, de Oliveira CC, Prieto JG, Ferrando A, Vila L, Alvarez AI. Quantitative assessment of nitric oxide in rat skeletal muscle and plasma after exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 88: 189-191, 2002.
- Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol. Scand.* 166: 261-277, 1999.
- Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* 170: 143-223, 1997.
- Pette D, Staron RS. The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *NIPS* 8: 153-157, 1993.
- Pette D, Vrbová G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 120: 116-202, 1992.
- Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116: 1-76, 1990.
- Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL. Induction of neuronal type of nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.* 82: 1250-1255, 1997.
- Ribeiro M, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303, 1992.

- Roberts CK, Barnard RJ, Jasman A, Balon TW. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277: E390-E394, 1999.
- Rudnick J, Puttmann B, Tesch PA, Alkner B, Schoser BG, Salanova M, Kirsch K, Gunga HC, Schiffli G, Luck G, Blottner D. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J.* 18: 1228-1230, 2004.
- Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76: 371-423, 1996.
- Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 493-501, 1994.
- Sheehy AM, Phung YT, Riemer RK, Black SM. Growth factor induction of nitric oxide synthase in rat pheochromocytoma cells. *Mol. Brain Res.* 52: 71-77, 1997.
- Smith LW, Smith JD, Criswell DS. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J. Appl. Physiol.* 92: 2005-2011, 2002.
- Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81: 209-237, 2001.
- Staron RS, Pette D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100: 149-153, 1993.
- Staron RS. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96: 21-24, 1991.
- Staron RS, Pette D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86: 19-23, 1986.
- Talmadge RJ, Roy RR, Caiozzo VJ, Edgerton VR. Mechanical properties of rats soleus after long-term spinal cord transection. *J. Appl. Physiol.* 93: 1487-1497, 2002.
- Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 23: 661-679, 2000.
- Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* 75: 2337-2340, 1993.

- Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92: 453-457, 1989.
- Tidball JG, Spencer MJ, Wehling M, Lavergne E. Nitric-oxide synthase is a mechanical signal transducer that modulates talin and vinculin expression. *J. Biol. Chem.* 274: 33155-33160, 1999.
- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275: C260-C266, 1998.
- Vassilakopoulos T, Deckman G, Kebbewar M, Rallis G, Harfouche R, Hussain SN. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284: L452-L457, 2003.
- Wilson JR, Kapoor S. Contribution of endothelium-derived relaxing factors to exercise-induced vasodilation in humans. *J. Appl. Physiol.* 75: 2740-2744, 1993.
- Zatz R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal Sci.* 40: 198-201, 1990.
- Zhang JS, Kraus WE, Truskey GA. Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C292-C299, 2004.

Figure 1: Serial cross-sections of SOL and EDL muscles assayed for myofibrillar ATPase after preincubation at pH 4.55 (**A, D**), pH 10.5 (**B**), pH 10.6 (**E**), pH 4.25 (**C**) and pH 4.35 (**F**). The fiber types are indicated as I, IC, IIA, IID and IIB (types I, IC, IIA, IID and IIB, respectively). Bar = 1 μ m, for all panels.

A) SOLEUS



B) EDL

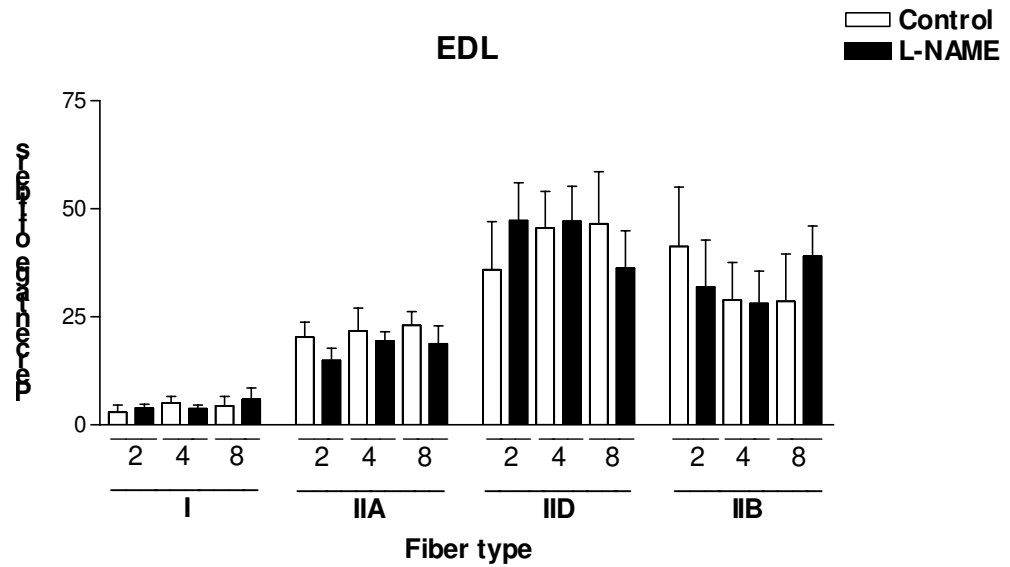
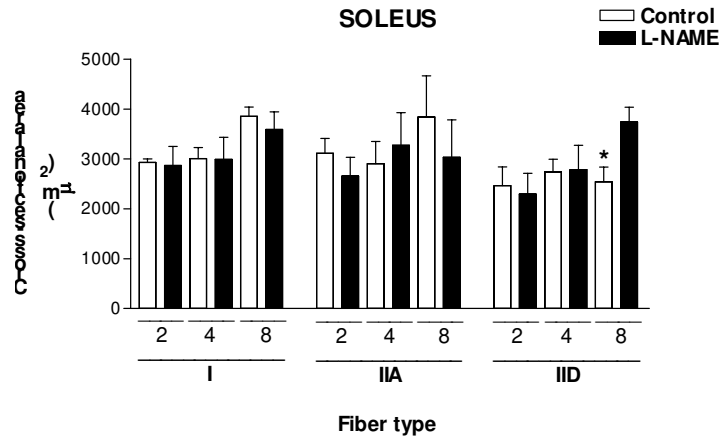


Figure 2: Percentage of fiber types in SOL (A) and EDL (B) muscles from rats treated with L-NAME for two, four and eight weeks. In SOL, there was a significant decrease in the percentage of type I fibers after two weeks of treatment while in EDL there were no significant changes in the percentage of fiber types in any of the L-NAME-treated groups compared to the corresponding controls. The columns are the mean $\pm$ S.D. of five rats each.

A) SOLEUS



B) EDL

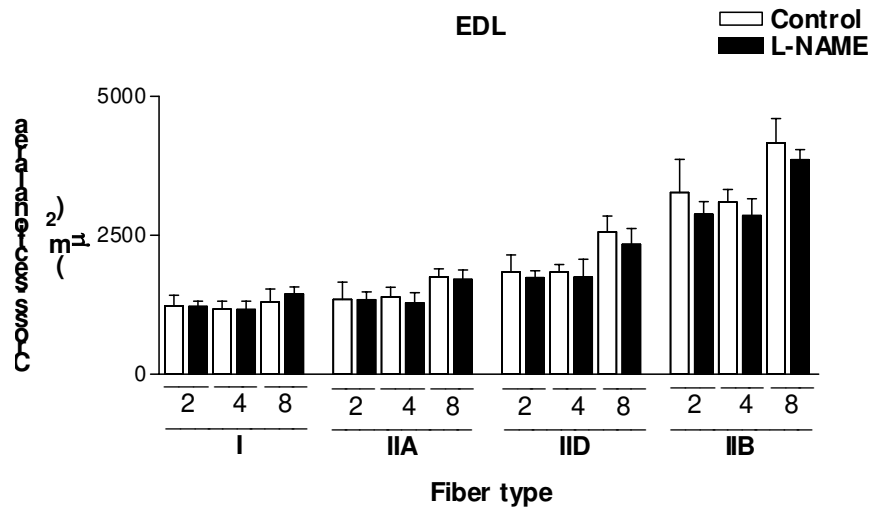
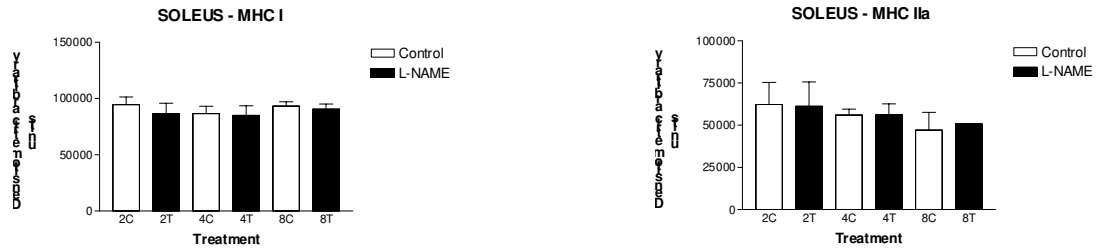


Figure 3: Cross-sectional areas of fiber types in SOL (A) and EDL (B) muscles from rats treated with L-NAME for two, four and eight weeks. In SOL, there was a significant increase of the cross-sectional area of type IID fibers after eight weeks of treatment, while in EDL there were no significant changes in the cross-sectional areas of the different fiber types in any of the L-NAME-treated groups compared to the corresponding controls. The columns are the mean $\pm$ S.D. of five rats each.

A) SOLEUS



B) EDL

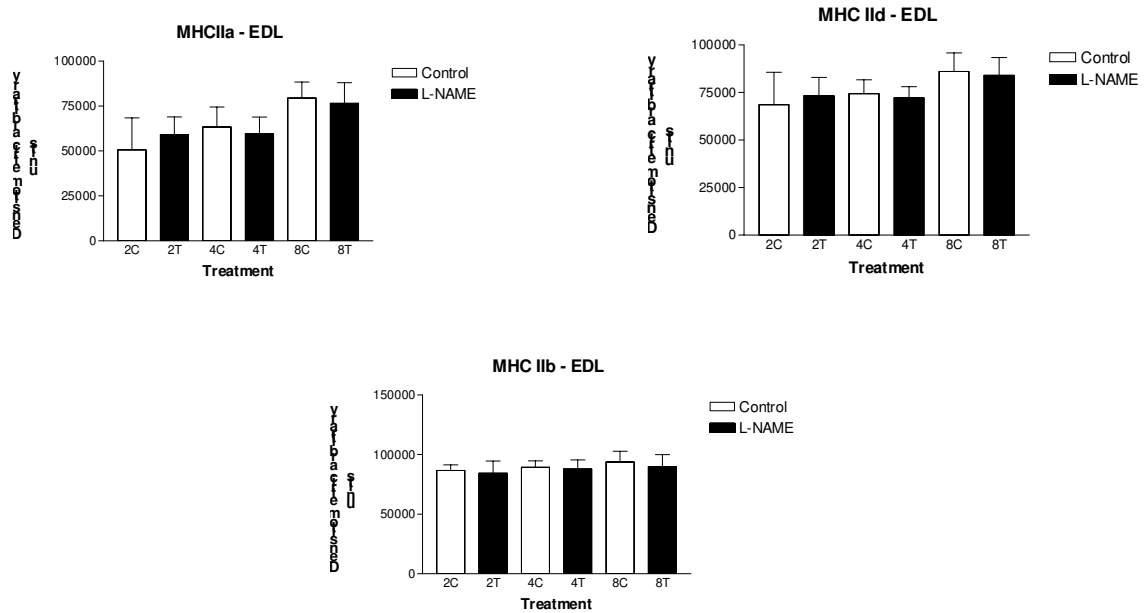


Figure 4: MHC expression in SOL (A) and EDL (B) muscles from rats untreated (2C, 4C, 8C) and treated with L-NAME (2T, 4T, 8T) for two, four and eight weeks. There were no significant differences in the expression of MHC isoforms in the two muscles studied. SOL contained predominantly MHC I and IIa isoforms, whereas EDL had MHC IIb, IIc and IIa isoforms. The columns are the mean $\pm$ S.D. of five rats each.

5. ARTIGO 2

Chronic treatment with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) does not affect the expression of nitric oxide synthase in rat *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles

Chronic treatment with N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) does not affect the expression of nitric oxide synthase in rat *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles

Ito, A.C.¹, Leonardo, M.B.¹, Panunto, P.C.³, Medeiros, M.V.³,
Campos, G.E.R.², Hyslop, S.³, Cruz-Höfling, M.A.^{1,*}

¹Departamento de Histologia e Embriologia and ²Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, ³Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Running title: NO and skeletal muscle NOS expression

*Author for correspondence: Maria Alice da Cruz-Höfling, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel./Fax 55-19-3788-6247. E-mail: hofling@unicamp.br

ABSTRACT

Skeletal muscle produces large amounts of nitric oxide (NO) that may be involved in the regulation of muscle metabolism and contractile activity. In this study, we examined the influence of the chronic administration of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (20 mg/rat/day) to rats for up to eight weeks on the expression of endothelial and neuronal nitric oxide synthases (eNOS and nNOS, respectively) in *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles. Treatment with L-NAME significantly increased the arterial blood pressure at all intervals, but produced no significant change in the expression and distribution of the NOS isoforms, as assessed by western blotting and immunohistochemistry. There were also no changes in the number of muscle fiber nuclei, used as an indicator of fiber hypertrophy. These results indicate that the chronic inhibition of NOS activity does not affect the expression and distribution of eNOS and nNOS in these rat skeletal muscles.

Key words: N^o-nitro-L-arginine methyl ester, Nitric oxide synthase I and III, Rat hindlimb muscle

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO), a free radical gas generated by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), is involved in numerous physiological processes, including leukocyte-endothelial cell interactions, blood flow, glucose uptake, glycolysis, mitochondrial respiration and muscle contraction (Kobzik *et al.*, 1994, Maréchal and Gailly, 1999, Stamler and Meissner, 2001). NO is also involved in various pathophysiological conditions. De-regulation of nNOS in brain has been associated with glutamate receptor overactivity and neuronal damage in animal models of stroke (Dawson *et al.*, 1992). In contrast, mutant mice lacking nNOS are relatively resistant to neuronal damage following focal cerebral ischemia (Huang *et al.*, 1994). Three isoforms of NOS (two constitutive and one inducible) are currently recognized (Stamler and Meissner, 2001, Punkt *et al.*, 2002). Endothelial and neuronal NOS (eNOS and nNOS or Types III and I, respectively), the two constitutive forms, were originally characterized in endothelial cells and neurons, respectively (Brenman *et al.*, 1995), although both are also expressed in other cell types. eNOS contributes to the endothelium-dependent relaxation of blood

vessels, while nNOS modulates diverse physiological cellular processes in neurons, epithelial cells, mesangial cells, and skeletal muscle cells.

In many cell types, including neurons, nNOS immunoreactivity is detected in the rough endoplasmic reticulum, mitochondria and specialized electron-dense synaptic membrane structures, while in skeletal muscle nNOS is associated with the sarcolemma (Kobzik *et al.*, 1994), and with the neuromuscular junction and mitochondria (Kobzik *et al.*, 1995, Reid, 2001, for review, see Grozdanovic and Baumgarten, 1999). eNOS is associated with endothelial membrane and skeletal muscle mitochondria (Kobzik *et al.*, 1995). nNOS is expressed at higher levels in human (Nakane *et al.*, 1993) and rat (Kobzik *et al.*, 1994) skeletal muscle than in brain. In mature skeletal muscle, nNOS is enriched in fast-twitch muscle fibers, where NO modulates the development of contractile force (Kobzik *et al.*, 1994). Inhibition of NOS by treating rats with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes a progressive severe reduction in walking speed, walking velocity, and muscle cross-sectional area and mass (Wang *et al.*, 2001). nNOS activity is dramatically reduced in the sarcolemma of dystrophin-deficient muscle from humans and *mdx*-mice, a dystrophic mouse model (for review see, Stamler and Meissner, 2001, Marques, 2004). In *mdx* mice, exogenous NO reduced the severity of dystrophy and promoted muscle growth and repair (Wehling *et al.*, 2001, Anderson and Vargas 2003).

Prolonged treadmill training increases the protein expression of nNOS and eNOS in *soleus* muscle homogenates (Balon and Nadler, 1997), whereas chronic (three weeks) electrical stimulation of the *tibialis* anterior and *extensor digitorum longus* muscle of rabbits increased the nNOS activity and protein levels by two-fold (Reiser *et al.*, 1997). Changes in muscle activity and mechanical load affect fiber composition, nNOS expression, and NO production (Tidball *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002).

In this work, we used western blotting and immunohistochemistry to investigate the expression of nNOS and eNOS in the *soleus* (SOL, slow-twitch, predominantly oxidative) and *extensor digitorum longus* (EDL, fast-twitch predominantly glycolytic) muscles of rats treated with N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) for up to eight weeks. This work complements an investigation in which we used m-ATPase-based

histochemistry and the electrophoretic profiles of myosin heavy chain (MHC) isoform expression to assess the fiber-type transition in these muscles after long-term treatment with L-NAME.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty male Wistar rats (150 g at the start of the experiment) were obtained from the Central Animal House of the State University of Campinas. The rats were housed in standard plastic cages at a constant temperature of 25°C with free access to food and water. The experiments described here were done within the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Treatment with L-NAME

The rats received L-NAME (20 mg/rat/day) in the drinking water for two, four and eight weeks (n=5 rats/period) (Ribeiro *et al.*, 1992). Control rats received tap water. Systemic arterial blood pressure was measured by a tail-cuff method in conscious rats (Zatz, 1990). Blood pressure was measured before treatment and then at weekly intervals throughout the experiment. The rats in all groups were also weighed on the same day as the blood pressure measurements were taken.

Tissue collection

At the end of each interval of treatment, control and L-NAME-treated rats were anesthetized with urethane (1 g/kg body weight, i.p.) then perfused transcardially with heparinized 0.9% NaCl. The SOL and EDL muscles were quickly dissected from the right hindlimb, embedded in tragacanth gum and immediately frozen in isopentane cooled to -159 °C in liquid nitrogen. The tissues were then stored at -70 °C until processed.

Western blotting

Muscles (SOL and EDL) were homogenized in an extraction cocktail (10 mM EDTA, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaVO₄, 10 µL of aprotinin/mL and 100 mM Tris, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 3,000 g for 10 min and the supernatants collected and stored at -70°C until used for immunoblotting. Protein concentrations were determined with a Bio-Rad protein assay kit. Aliquots of SOL (50 µg) and EDL (50 µg) were applied to 8% or 10% polyacrylamide gels (Hames, 1990). After SDS-PAGE, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting (Towbin *et al.*, 1979), and the membrane then blocked for 1 h at room temperature (RT) in Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 with 5% non-fat milk. The blots were incubated overnight at 4°C with polyclonal anti-nNOS (NOS I) or monoclonal anti-eNOS (NOS III)

antibodies (both diluted 1:1000 in TBS; Transduction Laboratories, Lexington, KY). The membranes were subsequently rinsed six-times (10 min each) in TBS and then incubated with the respective HRP-conjugated secondary antibody (Sigma or Amersham) (diluted 1:1000-1:2000 in TBS) for 1 h at RT. After rinsing in buffer, the immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (Super Signal, Pierce) using X-ray film (Kodak). Densitometric analysis were done using Scion Image software.

Immunohistochemistry

NOS expression in muscles from control and L-NAME-treated rats was also assessed by immunohistochemistry using tissues obtained as described above. Cryostat cross-sections (12 μ m thick) were collected on silane-coated glass slides, air dried and fixed in cold acetone (4°C) for 4 min at RT. The sections were washed in 0.05 M Tris-buffered saline, pH 7.4 (TBS) for 5 min at RT. To quench endogenous peroxidase activity, sections were treated with methanol containing 0.3% H₂O₂ for 30 min at RT, after which they were rinsed four times with TBS (5 min each). Non-specific sites were blocked with TBS containing 5% non-fat milk at RT for 1 h. The sections were then incubated at 4°C overnight with primary antibodies to nNOS or eNOS (diluted 1:30 in TBS containing 1% non-fat milk; Santa Cruz Biotechnology). After washing in TBS, the bound primary antibodies were detected by incubating the sections with biotinylated antibody (Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:4 in serum blocking solution) for 30 min at RT, followed by washing in TBS and incubation with HRP-streptavidin (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at RT. The sections were subsequently washed four times in TBS (5 min each). The reaction was developed using 3,3-diaminobenzidine (DAB, Sigma) and stopped with distilled water. The slides were counterstained with Harris' hematoxylin, mounted with Permount and examined by light microscopy. For negative controls, the primary antibodies were omitted.

Counting of muscle fiber nuclei

The sections of SOL and EDL muscle used for NOS immunohistochemistry were also used to count the muscle fiber nuclei. In these sections, the nuclei were stained blue and were easily distinguishable and countable. Quantification was done by counting the nuclei from 25 fibers (from control and L-NAME-treated rats) in ten non-overlapping areas to give a total of 250 fibers per treatment interval (two, four and eight weeks).

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SD, where appropriate. The densitometric values of the immunoreactive bands (NOS expression) were analyzed using the GraphPad Prism software package.

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was used to compare the control and treated groups. A value of $p < 0.05$ indicated significance.

RESULTS

Arterial blood pressure and body weight measurements

Table 1 shows that there was a significant increase in blood pressure in all of the L-NAME-treated groups compared to the corresponding controls. In contrast, there were no significant differences in the body weights between control and treated rats in any of the treatment intervals.

Western blot analysis

Figure 1 shows that although there were slight fluctuations in the levels of expression of eNOS and nNOS in rat SOL and EDL muscle, there were no significant differences between control and L-NAME-treated groups at any of the time intervals.

Immunohistochemical analysis

Figures 2 shows the immunolabeling patterns of eNOS and nNOS in SOL and EDL, respectively, after four weeks of treatment. Both NOS isoforms were localized in the subsarcolemmal region, and the labeling was stronger for nNOS than for eNOS. Light microscopy resolution did not permit distinguish if eNOS immunolabeling underneath sarcolemma were due to the subsarcolemmal mitochondria population. However, there were no consistent differences in the intensities of labeling between control and L-NAME-treated rats. Similar findings were obtained for two and eight weeks (not shown).

Muscle fiber nuclei

Table 2 shows that there were no significant differences in the number of nuclei between control and L-NAME-treated rats in either the SOL or EDL.

DISCUSSION

Skeletal muscle is one of the richest sources of NO in mammals and the NO produced has an important role in modulating muscle function (for reviews, see Maréchal and Gailly, 1999, Grozdanovic, 2001 and Stamler and Meissner, 2001). The chronic inhibition of NOS activity by inhibitors such as L-NAME has shown that NO has an important role in regulating blood pressure (reviewed in Zatz and Baylis, 1998). Other functions attributed to NO include the modulation of neuromuscular transmission, muscle contraction force, mitochondrial respiration and glucose metabolism (Reid, 1998, Maréchal and Gailly, 1999).

The chronic administration of L-NAME to rats reduces blood flow to muscle, presumably by inhibiting eNOS (Wilson and Kapoor, 1993, Hirai *et al.*, 1994, Hickner *et al.*, 1997), increases the force developed during slow-twitch contractions (King-Vanvlack *et al.*, 1995), inhibits the contraction-induced uptake of glucose and the translocation of glucose transporter (GLUT-4) to the plasma membrane (Roberts *et al.*, 1997), reduces inflammation and muscle necrosis following hindlimb unloading and reloading (Pizza *et al.*, 1998), stimulates the addition of sarcomeres in rats following long-term immobilization (Koh and Tidball, 1999), decreases muscle weight, fiber cross-sectional area and walking speed (Wang *et al.*, 2001), is involved in overload-induced skeletal muscle hypertrophy (Smith *et al.*, 2002), reduces constitutive protein synthesis in muscle fibers (Rajendram *et al.*, 2003). Of these various studies, only two measured the activity of the NOS following blockade with L-NAME and observed a marked decrease (Wang *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2002). None of these studies investigated the expression of NOS isoforms following blockade of activity by L-NAME.

Smith *et al.* (2002) found no difference in the muscle mass, total protein concentration and cross-sectional area of *plantaris* fibers after treatment with L-NAME. However, Ito *et al.*, (unpublished results) found decreased percentage of type I fibers and increased cross-sectional area of type IID fibers in rat *soleus* muscle after two and eight weeks of L-NAME treatment, respectively. As shown here, the expression of eNOS and nNOS in rat SOL and EDL muscles was unaltered by treatment with L-NAME for up to

eight weeks, even though the increase in blood pressure indicated that the treatment had been effective. Immunohistochemistry showed the typical subsarcolemmal localization for nNOS (Kobzik *et al.*, 1994) and, less conspicuously, as scattered dots among the myofibrils. eNOS presented similar pattern, but it was impossible to define whether reactivity referred to sarcoplasmic areas where mitochondria were distributed in the fibers. However, the alterations in expression were not consistent. The lack of change in the number of fiber nuclei also suggested that there was no muscle fiber hypertrophy. Together, these results indicate that the chronic inhibition of NO production by L-NAME did not alter the expression of nNOS and eNOS in rat SOL and EDL muscles.

ACKNOWLEDGMENTS

A.C.I. was supported by studentship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), P.C.P. was supported by studentship from (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and M.V.M. was supported by a post-doctoral fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). M.A.C.H. and S.H. are also supported by research fellowships from CNPq. This work was partially supported by FAPESP (Proc. 98/06700-2, 96/11653-8) and CNPq (Proc. 477586/2003-1)

REFERENCES

- Anderson JE, Vargas C. Correlated NOS-Imu and myf5 expression by satellite cells in mdx mouse muscle regeneration during NOS manipulation and deflazacort treatment. *Neuromusc. Disord.* 13: 388-396, 2003.
- Balon TW, Nadler J. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 82: 359-363, 1997.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82: 743-752, 1995.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6368-6371, 1992.
- Grozdanovic Z. NO message from muscle. *Microsc. Res. Tech.* 55: 148-153, 2001.

- Grozdanovic Z, Baumgarten HG. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol. Histopathol.* 14: 243-256, 1999.
- Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D, eds.). *Gel Electrophoresis of Proteins – A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1990. p. 1-147.
- Hickner RC, Fisher JS, Ehsani AA, Kohrt WM. Role of nitric oxide in skeletal muscle blood flow at rest and during dynamic exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 273: H405-H410, 1997.
- Hirai T, Visneski MD, Kearns KJ, Zelis R, Musch TI. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 77: 1288-1293, 1994.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman ME, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885, 1994.
- King-Vanvack CE, Curtis SE, Mewburn JD, Cain SM, Chapler CK. Role of endothelial factors in active hyperemic responses in contracting canine muscle. *J. Appl. Physiol.* 79: 107-112, 1995.
- Kobzik L, Stringer B, Balligand J-L, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 375-381, 1995.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 346-348, 1994.
- Koh TJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 519: 189-196, 1999.
- Maréchal G, Gailly P. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 1088-1102, 1999.
- Marques MJ. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Braz. J. morphol. Sci.* 21: 73-79, 2004.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Fosterman U, Murrad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316: 175-180, 1993.
- Pizza FX, Hernandez IJ, Tidball JG. Nitric oxide synthase inhibition reduces muscle inflammation and necrosis in modified muscle use. *J. Leukoc. Biol.* 64: 427-433, 1998.
- Punkt K, Naupert A, Wellner M, Asmussen G, Schmidt C, Burchwalow IB. Nitric oxide synthase II in rat skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.* 118: 371-379, 2002.

- Rajendram R, Marway JS, Mantle D, Peters TJ, Preedy VR. Skeletal muscle and jejunal protein synthesis in normal and ethanol-treated rats: the effect of the nitric oxide synthase inhibitors, L- ω - nitro- L-arginine methyl ester and N(G)-nitro-L-arginine in vivo. *Metabolism* 52: 397-401, 2003.
- Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.* 82: 1250-1255, 1997.
- Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* 90: 724-731, 2001.
- Reid MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol. Scand.* 162: 401-409, 1998.
- Ribeiro M, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303, 1992.
- Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am. J. Physiol.* 273: E220-E225, 1997.
- Smith LW, Smith JD, Criswell DS. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J. Appl. Physiol.* 92: 2005-2011, 2002.
- Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81: 209-237, 2001.
- Tidball JG, Lavergne E, Lau KS, Spencer MJ, Stull JT, Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 275: C260-C266, 1998.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979.
- Wang M-X, Murrell DF, Szabó C, Warren RF, Sarris M, Murrell GAC. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide* 5: 219-232, 2001.
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.* 155: 123-131, 2001.
- Wilson JR, Kapoor S. Contribution of endothelium-derived relaxing factors to exercise-induced vasodilation in humans. *J. Appl. Physiol.* 75: 2740-2744, 1993.

Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 32: 958-964, 1998.

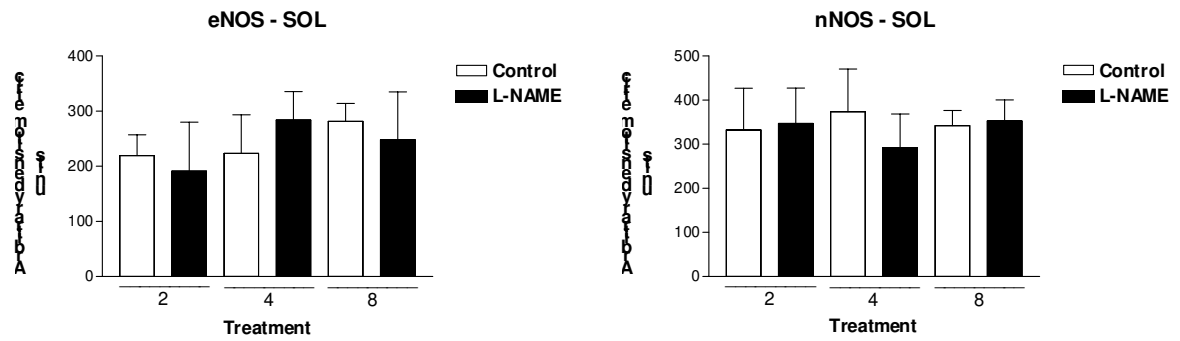
Zatz R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal Sci.* 40: 198-201, 1990.

Table 1. Body weight (g) and arterial blood pressure (mmHg) in the different groups of rats.

Treatment	2 weeks		4 weeks		8 weeks	
	BWT	ABP	BWT	ABP	BWT	ABP
Control	263 ± 18	121 ± 7	319 ± 21	130 ± 9	392 ± 18	125 ± 11
L-NAME	233 ± 21	170 ± 11*	301 ± 25	173 ± 15*	365 ± 22	178 ± 12*

The values are the mean ± SD of 15 rats/group; BWT- body weight; ABP – Arterial blood pressure; L-NAME – N^o-nitro-L-arginine methyl ester; *p< 0.05 compared to control (untreated) rats.

A) SOLEUS



B) EDL

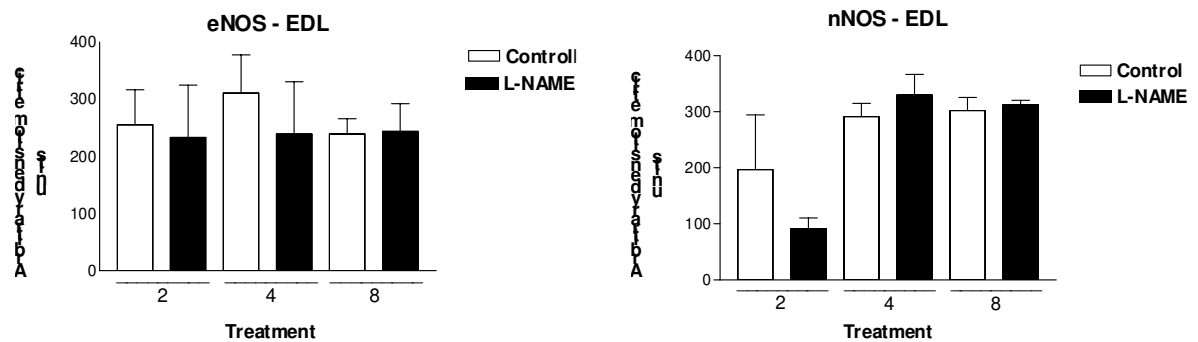


Figure 1: eNOS and nNOS expression in SOL (A) and EDL (B) muscle as determined by western blotting. There was no significant difference in the expression of the NOS isoforms in control and L-NAME-treated muscles at any of the time intervals (2, 4 and 8 weeks). The columns are the mean $\pm$ S.D. of five rats each.

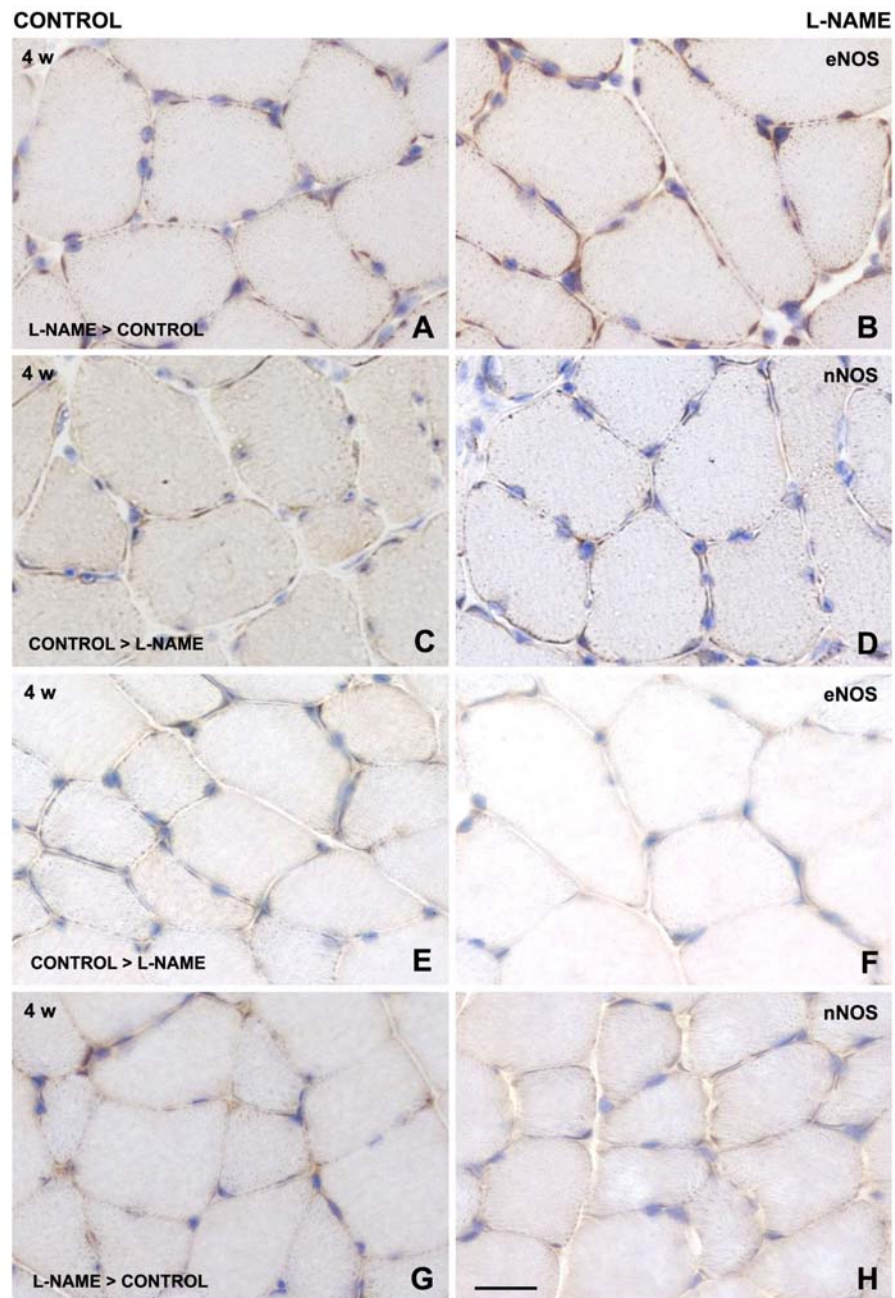


Figure 2: Immunohistochemical detection of eNOS and nNOS expression and distribution in SOL (A-D) and EDL (E-H) from control and L-NAME-treated (4 weeks) rats. The treatment with L-NAME enhanced immunolabeling of eNOS in SOL and nNOS in EDL, where decreased immunolabeling of eNOS in EDL and nNOS in SOL, when compared to matched controls. The tissue sections were processed and stained as described in Methods. Muscle fiber nuclei are stained blue and NOS isoforms appear as finely scattered spots, or especially as a thin line in the subsarcolemmal region. Similar findings were obtained for two and eight weeks of treatment with L-NAME (not shown). Bar = 10 μ m, for all panels.

Table 2. Number of muscle fiber nuclei in the different groups of rats.

Treatment	2 weeks		4 weeks		8 weeks	
	SOL	EDL	SOL	EDL	SOL	EDL
Control	50 ± 7	45 ± 3	49 ± 5	47 ± 5	47 ± 6	43 ± 9
L-NAME	55 ± 9	50 ± 6	55 ± 6	42 ± 8	44 ± 6	44 ± 8

The values are the mean ± SD; SOL – *Soleus*; EDL – *Extensor digitorum longus*; L-NAME - N^o-nitro-L-arginine methyl ester. There was no significant difference in the number of muscle fiber nuclei between control and L-NAME treated rats at any of the treatment intervals (n= 250 fibers/period).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu verificar que a administração crônica de L-NAME em ratos Wistar adultos jovens, machos, por duas, quatro e oito semanas, causou:

SOLEUS

- **Diminuição significativa ($p < 0.05$)** do número de **fibras do tipo I** após duas semanas (com subsequente e gradual recuperação após quatro e oito semanas, sem, contudo, atingir os níveis normais),
- **Aumento** de 72% de **fibras tipo IIA**, porém não significativamente, devido à variabilidade individual,
- **Aumento significativo ($p < 0.05$)** da área de secção transversal das fibras tipo IID,
- **Não** alterou a expressão das MHC-I e MHC-IIA,
- **Não** alterou a expressão das e-NOS e n-NOS, bem como a sua imunolocalização,
- **Não** alterou o número de núcleos das fibras em qualquer dos períodos de tratamento,

EDL

- **Aumento**, porém não significativamente, das fibras tipo IIB, que são predominantes neste músculo, após duas semanas de tratamento com L-NAME,
- **Não** alterou a expressão das isoformas MHC-I, -IIB e -IID,
- **Não** alterou a expressão das e-NOS e n-NOS, bem como a sua imunolocalização,
- **Não** alterou o número de núcleos das fibras em qualquer dos períodos de tratamento,

E, considerando-se, que:

Todos os animais desenvolveram significativa hipertensão em todos os períodos de tratamento,

temos como:

Conclusões específicas:

- O tratamento crônico com L-NAME foi efetivo e houve inibição ou diminuição importante da síntese do fator de relaxamento vascular, o óxido nítrico (NO),

- A deficiência de NO teve como alvo no *soleus*, sua fibra predominante, a fibra tipo I, diminuindo significativamente a sua proporção após duas semanas de tratamento. Uma vez que este tipo de fibra depende de metabolismo oxidativo, a diminuição do fluxo sanguíneo decorrente da deficiência de NO, afetaria a expressão fenotípica das fibras tipo I, passando-as de contração lenta para rápida. O aumento de 72% (embora não significativo) das fibras tipo IIA no *soleus* após duas semanas, e a leve tendência de aumento da expressão da MHC-IIa após quatro e oito semanas, dão suporte a esta conclusão. Da mesma forma, a tendência de diminuição da expressão da isoforma MHC-I, corrobora os dados relativos à diminuição da porcentagem de fibras tipo I, após duas semanas de tratamento. A recuperação gradual, porém incompleta, observada após quatro e oito semanas sugere adaptação do músculo e confirma sua plasticidade.
- As fibras tipo IID do *soleus*, o tipo de fibra menos freqüente neste músculo (3 a 5%) são mais sensíveis à deficiência crônica de NO respondendo com aumento da área seccional transversal (hipertrofia). Embora a literatura relate aumento (hipertrofia) da área seccional de fibras por conta de estímulos diversos, a explicação para o fenômeno não existe, e, no presente caso, também não está claro o serem as fibras tipo IID a responderem à falta de NO.

Conclusão geral:

- Uma vez que o mesmo estímulo, isto é, a deficiência de NO, reduz significativamente as fibras tipo I do *soleus*, mas não altera a porcentagem das fibras IIA e IID do mesmo músculo, e da mesma forma não altera a porcentagem de qualquer dos tipos de fibras do *EDL*, conclui-se que o mesmo padrão de estímulo resulta em diferentes respostas do *soleus* e do *EDL*, e mesmo do mesmo tipo de fibra, dependendo do músculo onde estão inseridas. Uma vez que a expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) parece ser principalmente regulada ao nível transcricional (Izumo *et al.*, 1986), os resultados presentes sugerem que os isogenes para as MHCs poderiam ser “ligados” ou “desligados” em decorrência do padrão de atividade e de uma maneira tipo-de-músculo-específica e tipo-de-fibra-específica. Em conclusão, às diferentes respostas do *soleus* e do *EDL* frente ao mesmo estímulo aponta para propriedades intrinsicamente diferentes entre o músculo “lento” e o músculo “rápido”.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, V., JUANG, H., YU, J., MOBIUS-WINKLER, S., FIEHN, E., LINKE, A., WEIGL, C., SCHULER, G., HAMBRECHT, R. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J. Am. Coll. Cardiol.* v. 33, p. 959-965, 1999.
- AMIN, A. R., ATTUR, M., PATEL, R. N., THAKKER, G. D., MARSHAL, P. J., REDISKE, J., STUCHIN, A. S., PATEL, I. R., ABRAMSON, S. B. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage – Influence of nitric oxide. *J. Clin. Invest.* v. 99, p. 1231-1237, 1997.
- ANDERSON, J. E., VARGAS, C. Correlated NOS-Imu and myf5 expression by satellite cells in mdx mouse muscle regeneration during NOS manipulation and deflazacort treatment. *Neuromusc. Disord.* v. 1, p. 388-396, 2003.
- ARGUELLO, A., LOPEZ-FERNANDEZ, J. L., RIVERO, J. L. Limb myosin heavy chain isoproteins and muscle fiber types in the adult goat (*Capra hircus*). *Anat. Rec.* v. 264, p.284-293, 2001.
- ARNAL, J. F., WARIN, L., MICHEL, J. B. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* v. 90, p. 647-652, 1992.
- BALON, T. W., NADLER, J. L. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* v. 82, p. 359-363, 1997.
- BARNARD, R. J., EDGERTON, V. R., FURUKAWA, T., PETER, J. B. Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* v. 220, p. 410-414, 1971.

- BAYLIS, C., MITRUKA, B., DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest.* v. 90, p. 278-281, 1992.
- BECKMAN, B. S., KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* v. 271, p. C1424-C1437, 1996.
- BERTORINI, T. E., BHATTACGARYA, S. K., PALMIERI, G. M. M. A., CHESNEY, C. M., PIFER, D., BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* v. 32, p. 1088-1092, 1982.
- BIFFL, W. L., Moore, E. E., MOORE, F. A., BARNETT, C. C. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1). *J. Surg. Res.* v. 63, p. 328-332, 1996.
- BIGGAR, W. D., KLAMUT, H. J., DEMACIO, P. C., STEVENS, D. J., RAY, P. N. Duchenne Muscular Dystrophy: current knowledge, treatment and future prospects. *Clin. Orthop.* v. 401, p. 88-106, 2002.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOCZKOWSKI, J., LANONE, S., UNGUREANU-LONGROIS, D., DANIALOU, G., FOURNIER, T., AUBIER, M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. *J. Clin. Invest.* v. 98, p. 1550-1559, 1996.
- BRADY, T. C., CHANG, L. Y., DAY, B. J., CRAPO, J. D. Extracellular superoxide dismutase with inducible nitric oxide synthase after NF-Kappa-B activation. *Am. J. Physiol.* v. 17, p. L1002-L1006, 1997.

- BRENMAN, J. E., CHAO, D. S., XIA, H., ALDAPE, K., BREDT, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* v. 82, p.743-752, 1995.
- BROOKE, M. H. , KAISER, K. K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulphydril dependence. *J. Histochem. Cytochem.* v. 18, p. 670-672, 1970.
- BRÜNE, B., SANDAU, K., VON KNETHEN, A. Apoptotic cell death and nitric oxide: activation and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry (Mosc.)* v. 63, p. 817-825, 1998a.
- BRÜNE. B., VON KNETHEN, A., SANDAU, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* v. 351, p. 261-272, 1998b.
- BURKE, R., LEVINE, D., TSAIRIS, P., ZAJAC, F. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* v. 234, n. 3. p. 723-748, 1973.
- BURKE, R. E., LEVINE, D. N., ZAJAC, F. E., TSAIRIS, P., ENGEL, W. K. Mammalian motor units: Physiological – histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* v. 147, p. 709-712, 1971.
- CAPANNI, C., SQUARZONI, S., PETRINI, S., VILLANOVA, M., MUSCARI, C., MARALDI, N. M., GUARNIERI, C., CALDARERA, C. M. Increase of neuronal nitric oxide synthase in rat skeletal muscle during ageing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 245, p. 216-219, 1998.
- CATTEL, V., JANSEN, A. Inducible nitric oxide synthase in inflammation. *Histochem. J.* v. 27, p. 777-784, 1994.
- CHANG, W. J., IANNACCONE, S. T., LAU, K. S., MASTERS, B. S., MCCABE, T. J., MCMILLAN, K., PADRE, R. C., SPENCER, M. J., TIDBALL, J. G.,

- STULL, T. J. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 93, p. 9142-9147, 1996.
- CHEN, L. Y., MEHTA, J. L. Downregulation of nitric oxide synthase activity in human platelets by nitroglycerin and authentic nitric oxide. *J. Invest. Med.* v. 45, p. 69-74, 1997.
- CLOSE, R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rats. *J. Physiol.* v. 251, p. C633-C642, 1967.
- COFFEY, A. J., ROBERTS, R. G., GREEN, E. D., COLE, C. G., BUTLER, R., ANAND, R., GIANNELI, F., BENTLEY, D. R. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* v. 12, p. 474-484, 1992.
- CORBETT, J. A., TILTON, R. G., CHANG, K., HASAN, K., IDO, Y., SON, J. R., MCDANIEL, M. L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* v. 41, p. 552-556, 1992.
- CRAIG, R. The Structure of the Contractile Filaments. In: ENGEL, A. G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (eds.). *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 134-175.
- CURRAN, R. D., FERRARI, F. K., KISPERT, P.H., STADLER, J., STUEHR, D. J., SIMMONS, R.L., BILLIAR, T. R. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J.* v. 5, p. 2085-2092, 1991.
- DAVISON, M. D., CRITCHLEY, D. R. Alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell* v. 52, p. 159-160, 1988.
- DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., LONDON, E. D., BREDET, D. S., SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88, p. 6368-6371, 1992.

- DRAPIER, J., HIBBS, J. B. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J. Immunol.* v. 140, p. 2829-2838, 1998.
- EDSTRÖM, L., KUGELBERG, E. Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* v. 31, p. 424-433, 1968.
- EL-DWAIRI, Q., GUO, Y., COMTOIS, A., ZHU, E., GREENWOOD, M. T., BRETT, D. S., HUSSAIN, S. N. Ontogenesis of nitric oxide synthases in the ventilatory muscles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* v. 18, p. 844-852, 1998.
- ENGEL, A. G. The Neuromuscular Junction. In: ENGEL, A. G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (eds.). *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 261-302.
- FERON, O., DESSY, C., OPEL, D. J., ARSTALL, M. A., KELLY, R. A., MICHEL, T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J. Biol. Chem.* v. 273, p. 30249-30254, 1998.
- FLEMING, I., BAUERSACHS, J., BUSSE, R. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol. Cell. Biochem.* v. 157, p. 137-145, 1996.
- FOLLAND, J. P., MAAS, H., JONES, D. A. The influence of nitric oxide on in vivo human skeletal muscle properties. *Acta Physiol. Scand.* v. 169, p. 141-148, 2000.
- FRANDSEN, U., LOPEZ-FIGUEROA, M., HELLSTEN, Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 227, p. 88-93, 1996.

- FUKUTO, J., CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 35, p. 165-194, 1995.
- GARCIA-CARDENA, G., MARTASEK, P., MASTERS, B. S., SKIDD, P. M., COUET, J., LI, S., LISANT, M. P., SESSA, W. C. Dissecting the interection between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 25437-25440, 1997.
- GARDINER, S. M., COMPTON, A. M., KEMP, P. A., BENNETT, T. Regional and haemodynamic effects of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Long Evans rats. *Br. J. Pharmacol.* v. 101, p. 625-631, 1990.
- GOSSRAU, R. Nitric oxide synthase I (NOS I) is a costameric enzyme in rat skeletal muscle. *Acta Histochem.* v. 100, p. 451-462, 1998.
- GROZDANOVIC, Z. NO Message from Muscle. *Microsc. Res. Tech.* v. 55, p. 148-153, 2001.
- GROZDANOVIC, Z., BAUMGARTEN, H. G. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signalling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol. Histopathol.* v. 14, p. 243-256, 1999.
- GUO, K., ANDRES, V., WALSH, K. Nitric oxide-induced downregulation of cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* v. 97, p. 2066- 2072, 1998.
- GUTH, L., SAMAHA, F. J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* v. 28, p. 365-367, 1970.
- HÄMÄLÄINEN, N., PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID and IIA in skeletal muscles of mouse, rat and rabbit. *J. Histochem. Cytochem.* v. 41, p. 733-743, 1993.

- HAMES, B. D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B. D., RICKWOOD, D. (eds.). *Gel Electrophoresis of Proteins – A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1990. p. 1-147.
- HAUSCHKA, S. D. The Embryonic Origin of Muscle. In: ENGEL, A. G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (eds.). *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 3-73.
- HICKNER, R. C., FISHER, J. S., EHSANI, A. A., KOHRT, W. M. Role of nitric oxide in skeletal muscle blood flow at rest and during dynamic exercise in humans. *Am. J. Physiol.* v. 273, p. H405-H410, 1997.
- HIRAI, T, VISNESKI, M. D., KEARNS, K. J., ZELIS, R., MUSCH, T. I. Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* v. 77, p. 1288-1293, 1994.
- HUANG, Z., HUANG, P. L., PANAHIAN, N., DALKARA, T., FISHMAN, M. E, MOSKOWITZ, M. A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* v. 265, p. 1883-1885, 1994.
- ICHIKI, T., USUI, M., KATO, M., FUKANOSHI, Y., ITO, K., EGASHIRA, K., TAKESHITA, A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* v. 31 (Suppl. S), p. 342-348, 1998.
- ISHII, K., CHANG, B., KERWIN, J. F., HUANG, Z. J., MURAD, F. N^o-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* v. 176, p. 219-223, 1990.
- IZUMO, S., NADAL-GINARD, B., MAHDAVI, V. All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue specific manner. *Science* v. 231, p. 597-600, 1986.
- KALIMAN, P., CANICIO, J., TESTAR, X., PALACIN, M., ZORZANO, A. Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and

- inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 17437-17444, 1999.
- KAWADA, N., KUROKI, T., UOYA, M., INOUE, M., KOBAYASHI, K. Smooth muscle alpha actin expression in rat hepatic stellate cells is regulated by nitric oxide and cGMP production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 229, p. 238-242, 1996.
- KELLY, A. M., RUBINSTEIN, N. A. The Diversity of Muscle Fiber Types and Its Origin during Development. In: ENGEL, A. G., FRANZINI-ARMSTRONG, C. (eds.). *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 119-133.
- KHATSENKO, O. Interactions between nitric oxide and cytochrome P-450 in the liver. *Biochemistry* v. 63, p. 833-839, 1998.
- KING, C. E., MELYNISHYN, M. J., MEWBURN, J. D., CURTIS, S. E., WINN, M. J., CAIN, S. M., CHAPLER, C. K. Canine hindlimb blood flow and O₂ uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J. Appl. Physiol.* v. 76, p. 1166-1171, 1994.
- KING-VANVLACK, C. E., CURTIS, S.E., MEWBURN, J.D., CAIN, S.M., CHAPLER, C. K. Role of endothelial factors in active hyperemic responses in contracting canine muscle. *J. Appl. Physiol.* v. 79, p. 107-112, 1995.
- KLABUNDE, R. E., RITGER, R. C., HELGREN, M. C. Cardiovascular actions of inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (nitric-oxide) formation/release in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.* v. 199, p. 51-59, 1991.
- KOBZIK, L., STRINGER, B., BALLIGAND, J. L., REID, M. B., STAMLER, J. S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 211, p. 375-381, 1995.
- KOBZIK, L., REID, M. B., BREDT, D. S., STAMLER, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* v. 372, p. 346-348, 1994.

- KOENIG, M., KUNKEL, L. M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* v. 265, p. 4560-4566, 1990.
- KOH, T. J., TIDBALL, J. G. Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* v. 519, p. 189-196, 1999.
- KUGELBERG, E. Histochemical composition, contraction speed and fatiguability of rat soleus motor units. *J. Neurol. Sci.* v. 20, n. 2, p. 177-198, 1972.
- KUPATT, C., WEBER, C., WOLF, D. A., BECKER, B. F., SMITH, T. W., KELLY, R. A. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium - Role of NF-kappa-B. *J. Moll. Cell. Cardiol.* v. 29, p. 2599-2609, 1997.
- LALA, P. K., ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev.* v. 17, p. 91-106, 1998.
- LAPIDOS, K. A., KAKKAR, R., MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signalling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.* v. 94, p. 1023-1031, 2004.
- LEE, K. H., BAEK, M. Y., MOON, K. Y., SONG, W. K., CHUNG, C. H., HA, D. B., KANG, M. S. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 14371-14374, 1994.
- LEFER, A. M., LEFER, D. J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules in the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* v. 32, p. 743-751, 1996.
- LIEBER, R. L. Skeletal Muscle Anatomy. In: LIEBER, R. L. (ed.). *Skeletal Muscle Structure and Function*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992. p. 1-48.

- MAGGI, C. A., BARBANTI, G., TURINI, D., GIULIANI, S. Effect of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. *Br. J. Pharmacol.* v. 103, p. 1970-1972, 1991.
- MARÉCHAL, G., GAILLY, P. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol. Life Sci.* v. 55, p. 1088-1102, 1999.
- MARLETTA, M. A., YOON, P. S., IYENGAR, R., LEAF, C. D., WISNHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* v. 27, p. 8706-8711, 1988.
- MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. *Braz. J. morphol. Sci.* v. 21, p. 73-79, 2004.
- MASON, C. A., CHANG, P., FALLERY, C., RABINOVITCH, M. Nitric oxide mediates LC-3-dependent regulation of fibronectin in ductus arteriosus intimal cushion formation. *FASEB J.* v.13, p. 1423–1434, 1999.
- MCCOMAS, A. J. Structure and Development. In: MCCOMAS, A. J. (ed.). *Skeletal muscle form and function*. Champaign: Human Kinetics, 1996. p. 1-89.
- MICHELSON, A. D., BENOIT, S. E., FURMAN, M. I., BRECKOLDT, W. L., ROHLER, M. J., BARNARD, M. R., LOSCALZO, J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am. J. Physiol.* v. 39, p. H1640-H1648, 1996.
- MONCADA, S., HIGGS, A., FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol. Rev.* v. 49, p. 137-142, 1997.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* v. 43, p. 109-142, 1991.

- MOORE, P. K., BABBEDGE, R. C., WALLACE, P., GAFFEN, Z. A., HART, S. L. 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the without increasing blood pressure. *Br. J. Pharmacol.* v. 108, p. 296-297, 1993.
- MOORE, P. K., AL-SWAYEH, A. O., CHONG, N. W. S., EVANS, R. A., GIBSON, A. N^{G} -Nitro-L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* v. 99, p. 408-412, 1990.
- MORENO JR, H., NATHAN, L. P., METZE, K., COSTA, S. K. P., ANTUNES, E., HYSLOP, S., ZATZ, R., DE NUCCI, G. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* v. 24, p. 349-352, 1997.
- MORENO JR, H., NATHAN, L. P., COSTA, S. K. P., METZE, K., ANTUNES, E., ZATZ, R. DE NUCCI, G. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* v. 287, p. 93-96, 1995.
- MORRISON, R. J., MILLER, C. C. III, REID, M. B. Nitric oxide effects on shortening velocity and power production in the rat diaphragm. *J. Appl. Physiol.* v. 80, p. 1065-1069, 1996.
- MUROHARA, T., SCALIA, R., LEFER, A. M. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells – possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ. Res.* v. 78, p. 780-789, 1996.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* v. 6, p. 3051-3064, 1992.

- NAKANE, M., SCHMIDT, H. H., POLLOCK, J. S., FOSTERMAN, U., MURRAD, F.
Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.
FEBS Lett. v. 316, p. 175-180, 1993.
- NEMETH, P., PETTE, D., VRBOVÁ, G. Comparison of enzyme activities among
single muscle fibers within defined motor units. *J. Physiol.* v. 311, p. 489-495,
1985.
- OHKOSHI, N., MIZUSAWA, H., FUJITA, T., SHOJI, S. Histological determination of
nitric oxide synthase (NOS) and NADPH-diaphorase in ragged-red fibers from
patients with mitochondrial encephalomyopathies. *J. Neurol. Sci.* v. 149, p. 151-
156, 1997.
- OLIVEIRA, C. R., CINTRA, K. A., TEIXEIRA, S. A., DE LUCA, I. M. S.,
ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats
under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor.
Eur. J. Pharmacol. v. 391, p. 121-126, 2000.
- PEREIRA, J. A. A. S., WESSELS, A., NIJTMANS, L., MOORMAN, A. F. M.,
SARGEANT, A. J. New method for the accurate characterization of single human
skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC
expression in pure and hybrid fibre types. *J. Muscle Res. Cell Motil.* v. 16, p. 21-34,
1995.
- PEREZ, A. C., DE OLIVEIRA, C. C., PRIETO, J. G., FERRANDO, A., VILA, L.,
ALVAREZ, A. I. Quantitative assessment of nitric oxide in rat skeletal muscle and
plasma after exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* v. 88, p. 189-191, 2002.
- PERKINS, W. J., HAN, Y.-S., SIECK, G. C. Skeletal muscle force and actomyosin
ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J. Appl. Physiol.* v. 83, p. 1326-
1332, 1997.

- PETER, J. B., BARNARD, R. J., EDGERTON, V. R., GILLESPIE, C. A., STEMPEL, K. E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* v. 11, p. 2627-2633, 1972.
- PETTE, D., PEUKER, H., STARON, R. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol. Scand.* v. 166, p. 261-277, 1999.
- 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. The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *NIPS* v. 8, p. 153-157, 1993.
- PETTE, D., VRBOVÁ, G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* v.120, p. 116-202, 1992.
- PETTE, D., STARON, R. S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* v. 116, p. 1-76, 1990.
- PIEROBON-BORMIOLI, S., SARTORE, S., LIBERA, L.D., VITADELLO, M., SCHIAFFINO, S. "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* v. 29, n. 10, p. 1179-1188, 1981.
- PIZZA, F. X., HERNANDEZ, I. J., TIDBALL, J. G. Nitric oxide synthase inhibition reduces muscle inflammation and necrosis in modified muscle use. *J. Leukoc. Biol.* v. 64, p. 427-433, 1998.
- PUNKT, K., NAUPERT, A., WELLNER, M., ASMUSSEN, G., SCHIMIDT, C., BURCHWALOW, I.B. Nitric oxide synthase II in rat skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.* v. 118, p. 371-379, 2002.
- RAJENDRAM, R., MARWAY, J. S. , MANTLE, D., PETERS, T.J., PREEDY, V. R. Skeletal muscle and jejunal protein synthesis in normal and ethanol-treated rats: the

- effect of the nitric oxide synthase inhibitors, L- ω - nitro- L- arginine methyl ester and N(G)-nitro-L-arginine in vivo. *Metabolism* v. 52, p. 397-401, 2003.
- RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signalling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* v. 24, p. 1575-1594, 2001.
- REES, D. D., PALMER, R. M. J., MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 85, p. 2334-2338, 1988.
- REID, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol.* v. 90, p. 724-731, 2001.
- REID, M. B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol. Scand.* v. 162, p. 401-409, 1998.
- REISER, P. J., KLINE, W. O., VAGHY, P. L. Induction of neuronal type of nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.* v. 82, p. 1250-1255, 1997.
- REMICK, D. G., VILLARETE, L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* v. 59, p. 471-475, 1996.
- REMOND, E. M., CAHILL, P. A., HODGES, R., ZHANG, S. M., SITZMANN, J. V. Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* v. 166, p. 469-479, 1996.
- RIBEIRO, M., ANTUNES, E., DE NUCCI, G., LOVISOLO, S. M., ZATZ, R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* v. 20, p. 298-303, 1992.

- RICHARD, V., BERBEAUX, A., LA ROCHELLE, C. D., GIUDICELLI, J. F. Regional coronary haemodynamic effects of two inhibitors of nitric oxide synthesis in anesthetized, open-chest dogs. *Br. J. Pharmacol.* v. 104, p. 59-64, 1991.
- RIEDE, U.N., FORSTERMAN, U., DREXLER, H. Inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* v. 32, p. 964-969, 1998.
- ROBERTS, C. K., BARNARD, R. J., JASMAN, A., BALON, T. W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v. 277, p. E390-E394, 1999.
- ROBERTS, C. K., BARNARD, R. J., SCHECK, S. H., BALON, T. W. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am. J. Physiol.* v. 273, p. E220-E225, 1997.
- RUBISTEIN, I., ABASSI, Z., COLEMAN, R., MILMAN F., WINAVER, J., BETTER, O. S. Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J. Clin. Invest.* v. 101, p. 1325-1333, 1998.
- RUDNICK, J., PUTTMANN, B., TESCH, P. A., ALKNER, B., SCHOSER, B. G., SALANOVA, M., KIRSCH, K., GUNGA, H. C., SCHIFFL, G., LUCK, G., BLOTTNER, D. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J.* v. 18, p. 1228-1230, 2004.
- SCHIAFFINO, S., REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* v. 76, p. 371-423, 1996.
- SCHIAFFINO, S., REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* v. 77, p. 493-501, 1994.

- SHEEHY, A. M., PHUNG, Y. T., RIEMER, R. K., BLACK, S. M. Growth factor induction of nitric oxide synthase in rat pheochromocytoma cells. *Mol. Brain Res.* v. 52, p. 71–77, 1997.
- SMITH, L. W., SMITH, J. D. , CRISWELL, D. S. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J. Appl. Physiol.* v. 92, p. 2005-2011, 2002.
- SOUTHAN, C. J., SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* v. 51, p. 383-394, 1996.
- STAMLER, J. S., MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.
- STARON, R. S., PETTE, D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* v. 100, p. 149-153, 1993.
- STARON, R. S. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* v. 96, p. 21-24, 1991.
- STARON, R. S., GOHLSCH, B., PETTE, D. Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* v. 408, p. 444-450, 1987.
- STARON, R. S., PETTE, D. The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically-typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem. J.* v. 243, p. 695-659, 1987a.
- STARON, R. S., PETTE, D. The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically-typed single fibres. Rabbit soleus muscle. *Biochem. J.* v. 243, p. 687-693, 1987b.

- STARON, R. S., PETTE, D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit skeletal muscle fibers. *Histochemistry* v. 86, p. 19-23, 1986.
- STOCKDALE, F. E., MILLER, J. B. The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. *Dev. Biol.* v. 123, p. 1-9, 1987.
- TALMADGE, R. J., ROY, R. R., CAIOZZO, V. J., EDGERTON, V. R. Mechanical properties of rats soleus after long-term spinal cord transection. *J. Appl. Physiol.* v. 93, p. 1487-1497, 2002.
- TALMADGE, R. J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* v. 23, p. 661-679, 2000.
- TALMADGE, R. J., ROY, R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy chain isoforms. *J. Appl. Physiol.* v. 75, p. 2337-2340, 1993.
- TAMBASCIA, R. C., FONSECA, P. M., CORAT, P. D. C., MORENO JR, H., SAAD, M. J. A., FRANCHINI, K. G. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension* v. 37, p. 1423-1428, 2001.
- TAYLOR, B. S., ALARCON, L. H., BILLIAR, T. R. Inducible nitric oxide in the liver: regulation and function. *Biochemistry (Mosc.)* v. 63, p. 766-781, 1998.
- TERMIN, A., STARON, R. S., PETTE, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* v. 92, p. 453-457, 1989.
- TEWS, D. S., GOEBEL, H. H. Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin. Immunol. Immunopathol.* v. 87, p. 240-247, 1998.

- TEWS, D. S., GOEBEL, H. H., SCHNEIDER, I., GUNKEL, A., STENNERT, E., NEISS, W.F. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* v. 56, p. 1283-1289, 1997.
- TIDBALL, J. G., SPENCER, M. J., WEHLING, M., LAVERGNE, E. Nitric-oxide synthase is a mechanical signal transducer that modulates talin and vinculin expression. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 33155-33160, 1999.
- TIDBALL, J. G., LAVERGNE, E., LAU, K. S., SPENCER, M. J., STULL, J. T., WEHLING, M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* v. 275, p. C260-C266, 1998.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TROY, C. M., DEROSI, D., PROCHIANTZ, A., GREENE, L. A., SHELANSKI, M. L. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. Neurosci.* v. 16, p. 253-261, 1996.
- TSURUMI, Y., MUROHARA, T., KRASINSKI, K., CHEN, D. F., WITZENBICHLER, B., KEARNEY, M., COUFFINHAL, T., ISNER, J. M. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nature Medicine* v. 3, p. 879-886, 1997.
- USUI, M., ICHIKI, T., KATOH, M., EGASHIRA, K., TAKESHITA, A. Regulation of angiotensin II receptor expression by nitric oxide in rat adrenal gland. *Hypertension* v. 32, p. 527-533, 1998.
- VASSILAKOPOULOS, T., DECKMAN, G., KEBBEWAR, M., RALLIS, G., HARFOUCHE, R., HUSSAIN, S. N. Regulation of nitric oxide production in limb

- and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* v. 284, p. L452-L457, 2003.
- VAN GELDEREN, E. M., BOER, M. O. D., SAXENA, P. R. N^{G} -Nitro-L-arginine methyl ester: systemic and pulmonary haemodynamics, tissue blood flow and arteriovenous shunting in the pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* v. 348, p. 414-423, 1993.
- WALLACE, D. R., BOOZE, R. M. Upregulation of (+)-7-hydroxy-N,N-DI-N-[3H] propyl-2-aminotetralin binding following intracerebroventricular administration of a nitric oxide generator. *Neurochem. Res.* v. 22, p. 163-170, 1997.
- WANG, M.-X., MURRELL, D. F., SZABÓ, C., WARREN, R. F., SARRIS, M., MURRELL, G. A. C. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide* v. 5, p. 219-232, 2001.
- WEHLING, M., SPENCER, M. J., TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.* v. 155, p. 123-131, 2001.
- WILSON, J. R., KAPOOR, S. Contribution of endothelium-derived relaxing factors to exercise-induced vasodilation in humans. *J. Appl. Physiol.* v. 75, p. 2740-2744, 1993.
- WOLIN, M.S., DAVIDSON, C. A., KAMINSKI, P. M., FAYNGERSH, S. P., MOHAZZAB, K. M. Oxidant nitric oxide signaling mechanisms in vascular tissue. *Biochemistry (Mosc.)* v. 63, p. 810-816, 1998.
- ZAPPELLINI, A., MORENO JR, H., ANTUNES, E., DE NUCCI, G. Dissociation between the increase in systemic vascular resistance induced by acute nitric oxide synthesis inhibition and the decrease in cardiac output in anaesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* v. 29, p. 45-48, 1997.

- ZATZ, R., BAYLIS, C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* v. 32, p. 958-964, 1998.
- ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. *Lab. Animal Sci.* v. 40, p. 198-201, 1990.
- ZHANG, J. S., KRAUS, W. E., TRUSKEY, G. A. Stretch-induced nitric oxide modulates mechanical properties of skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v. 287, p. C292-C299, 2004.