

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Fernando José Gondim Peixoto

**ADAPTAÇÕES BIOQUÍMICAS EM FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE
EQÜINOS TREINADOS PARA ENDURO: CORRELAÇÃO ENTRE TIPAGEM
MUSCULAR E EXPRESSÃO DA ISOFORMA NEURONAL DA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASE.**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de doutor em
Biologia Funcional e Molecular, área de
concentração Bioquímica.*

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Departamento de Bioquímica – IB

UNICAMP

Campinas - 2004

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

Peixoto, Fernando José Gondim

P359a

Adaptações bioquímicas em fibras musculares esqueléticas de equinos treinados para enduro: correlação entre tipagem muscular e expressão da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase / Fernando José Gondim Peixoto.--

Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Ione Salgado

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .

Instituto de Biologia.

1. Óxido nítrico. 2. Equino. 3. Treinamento. I. Salgado, Ione.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Banca Examinadora_____

Data da Defesa: 27 / Maio / 2004

Profa. Dra. Ione Salgado_____

(Depto. Bioquímica/Instituto de Biologia/UNICAMP – Orientadora)

Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva_____

(Depto. Bioquímica/Instituto de BiologiaB/UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Júlia Marques_____

(Depto. Anatomia/Instituto de Biologia /UNICAMP)

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes_____

(Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP-São Paulo)

Prof. Dr. Armindo Antonio Alves_____

(Faculdade de Ciências da Saúde/Universidade de Araras)

Prof. Dr. Francesco Langone_____

(Depto. Fisiologia/Instituto de Biologia/UNICAMP)

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles_____

(Depto. Bioquímica/Instituto de Biologia/UNICAMP)

Dedicatória_____

À minha esposa,

Renat e St ephanes Soboll

Aos meus f ilhos,

Aar on e Felipe

À minha mãe,

J asiva Rosa Gondim

Agradecimentos_____

Aos proprietários dos cavalos utilizados nos experimentos. Sr. Cláudio Bagarolli, Sr. José Luis di Túlio, Prof. Dr. José Busnardo Neto, Sr. Walter Woerle, Sr. Jan Philip Pool, Sr. Marcos Camilo, Sr. Walter Maleronka, Sr. Régis Leal.

À CAPES, FAEP/UNICAMP e FAPESP pelo suporte financeiro.

À empresa Merial Saúde Animal, na pessoa do Dr. Henry Berger, pelo apoio financeiro em congresso científico.

Aos nossos cavalos, WS Ibn Morgaan, Witr Van Palas, HTM Lonee e Amapola, fonte primária de motivação e que deixaram enorme saudade.

Aos Professores Doutores, Gerson Eduardo Ramos Campos e Marcelo Alvarenga, pela supervisão nos experimentos com tipagem muscular e imunohistoquímica, respectivamente.

Aos colegas de laboratório, especialmente à Luzia Valentina Modolo, pelo agradável e profícuo convívio e pela supervisão nos experimentos com radioisótopos.

Aos Professores membros das bancas de qualificação e defesa, Profa. Dra. Lúcia Pereira da Silva, Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, Profa. Dra. Maria Júlia Marques, Prof. Dr. Humberto Santo Neto, Prof. Dr. Armino Antonio Alves, pela criteriosa correção do trabalho e da tese.

À minha amável orientadora, Profa. Dra. Ione Salgado, pelo profissionalismo e companheirismo durante todo o desafiante transcurso de meu doutoramento.

À Marina e Andréa pelo zelo burocrático e solicitude.

A todos os profissionais dos laboratórios onde os experimentos foram realizados, pelo imprescindível suporte técnico. Marquinhos, Cristiano, Helena, Mariza, Nuri, Elzira e Jusceley.

Tributos _____

*“Em ciência, a autoridade de um milhar, não é superior
ao humilde raciocínio de uma única pessoa”.*

Galileu Galilei

*“As três formas de se alcançar o paraíso na terra: nas páginas de um
bom livro, no colo da mulher amada e no dorso de um bom cavalo”.*

Provérbio árabe

Índice geral.....

BANCA EXAMINADORA.....	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
TRIBUTOS.....	vi
ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Justificativa.....	1
1.2 - Plasticidade Muscular.....	5
1.2.1 - As Fibras musculares.....	6
1.2.2 - Tipagem Muscular.....	9
1.2.3 - Tipagem muscular em eqüinos.....	10
1.2.3.1 - Fatores que influenciam a tipagem muscular em cavalos.....	13
1.2.4 - Treinamento de resistência.....	14
1.2.4.1 - Treinamento de resistência e tipagem muscular em cavalos de enduro.....	16
1.3 - Estresse oxidativo e nitrosativo.....	19
1.3.1 - Radicais livres no exercício.....	19
1.3.2 - Fontes produtoras de radicais livres no exercício.....	20
1.3.3 - Defesa enzimática antioxidante.....	21
1.3.4 - Sistema Óxido Nítrico / Óxido Nítrico Sintase.....	22
1.3.4.1 - Óxido Nítrico (NO).....	22
1.3.4.1.1 - A biosíntese de NO.....	23
1.3.4.1.2 - Ações e alvos do NO.....	24
1.3.4.1.3 - Ações e alvos do NO no músculo.....	27
1.3.4.1.4 - Ativação de células satélites pelo NO.....	32
1.3.4.2 - Óxido Nítrico Sintase (NOS).....	32

Índice geral _____

1.3.4.2.1 - Expressão da nNOS e de seus “splicings” alternativos...	35
1.3.4.2.2 - Regulação da atividade da NOS.....	36
1.3.4.3 - NO/NOS na lesão muscular.....	37
1.3.4.4 - NO e NOS no exercício.....	39
1.3.4.5 - Óxido Nítrico Sintase e Tipagem Muscular.....	40
2 - OBJETIVOS.....	42
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 - Animais.....	43
3.2 - Coleta de Biópsias.....	44
3.2.1 - Técnica de coleta.....	45
3.3 - Processamento das Biópsias.....	46
3.3.1 - Histoquímica, Imunohistoquímica e Eletroforese.....	46
3.3.2 - Atividade Enzimática.....	48
3.4 - Análise das Isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (<i>MyHC</i>).....	48
3.4.1 - Preparo da Amostra.....	48
3.4.2 - Protocolo de Separação (SDS-PAGE).....	48
3.4.3 - Análise Computacional de Imagens.....	49
3.5 - Tipagem de Fibras Musculares.....	49
3.5.1 - Preparo da Amostra.....	49
3.5.2 - Reação Histoquímica para a mATPase.....	50
3.5.3 - Reação Histoquímica Catalítica da Atividade de NADH Diaphorase.....	50
3.6 - Determinação da Área de Secção Transversal das Fibras – Morfometria.....	51
3.7 - Imunolocalização da nNOS – Imunohistoquímica.....	52
3.7.1 - Padronização da Imunohistoquímica em Cérebro de Rato.....	52
3.7.2 - Imunolocalização da nNOS em Músculo Esquelético Equino.....	53
3.8 - Quantificação da Atividade Enzimática da NOS.....	54
3.8.1 - Dosagem de Proteína.....	55
3.9 - Análise Estatística.....	56

Índice geral _____

4 - RESULTADOS.....	57
4.1 - Cadeia Pesada da Miosina (MyHC).....	57
4.2 - Tipagem Muscular.....	59
4.3 - Histoquímica para NADH Desidrogenase.....	63
4.4 - Área de Secção Transversal	65
4.5 - Imunolocalização da nNOS.....	67
4.5.1 - Imunolocalização da nNOS em Cérebro e Cerebelo de Rato.....	67
4.5.2 - Imunolocalização da nNOS em Músculo Esquelético Equino.....	69
4.6 - mATPase e Localização da NOS em “Ring Fibers”.....	72
4.7 - Atividade Óxido Nítrico Sintase.....	74
5 - DISCUSSÃO.....	76
5.1 - Tipagem muscular. Miosinas, mATPase e NADH desidrogenase.....	76
5.1.1 - Predição do desempenho atlético pela tipagem muscular.....	79
5.1.2 - Perspectivas quanto à utilização da tipologia muscular na seleção equina.....	80
5.2 - Expressão da nNOS e atividade de NOS.....	81
5.2.1 - Implicações fisiológicas e clínicas da expressão muscular da NOS. Envolvimento do sistema NO/NOS na fisiopatologia da lesão muscular.....	87
6 - CONCLUSÕES.....	89
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8 - APÊNDICE I.....	112
APÊNDICE II.....	113
APÊNDICE III (Trabalho submetido à publicação).....	114

Índice de tabelas e figuras

Figura 1 - Gráfico demonstrativo da revisão bibliográfica no Science Citation Index Expanded.....	4
Figura 2 - Modelo da molécula de miosina.....	6
Tabela I - Características bioquímicas das fibras musculares.....	8
Tabela II - Tipos de fibras musculares em equinos.....	12
Figura 3 - Fatores que afetam as transições das fibras musculares.....	16
Figura 4 - Vias de formação de EROs e ERNs.....	21
Figura 5 - Representação da reação de formação do NO.....	24
Figura 6 - Representação do efeito vasodilatador do NO liberado pelo músculo.....	35
Figura 7 - Estrutura das isoformas e “splincings” alternativos da NOS	38
Figura 8 - Agulhas utilizadas para as coletas das biópsias.....	45
Figura 9 - Descrição da determinação do ponto de coleta das biópsias.....	46
Figura 10 - Imagem representativa da determinação da área de secção transversal das fibras.....	52
Figura 11 - Foto de gel de SDS-PAGE mostrando as Isoformas musculares de <i>MyHC</i>	57
Figura 12 - Gráfico das concentrações musculares das isoformas de <i>MyHC</i>	59
Figura 13 - Tipagem de fibras musculares pela mATPase.....	61
Figura 14 - Gráfico da distribuição relativa dos quatro tipos de fibras musculares...62	
Figura 15 - Análise fotográfica comparativa entre a tipagem por mATPase e NADH diaphorase.....	65
Tabela III - Área de secção transversal dos quatro tipos de fibras	66
Figura 16 - Análise fotográfica da reação imunohistoquímica para a nNOS em cérebro e cerebelo de rato.....	68
Figura 17 - Análise fotográfica da reação imunohistoquímica para a nNOS em músculo eqüino.....	70
Figura 18 - Fotos da reação histoquímica para a mATPase mostrando a “ring fiber”	73
Figura 19 - Imagem de reação imunohistoquímica positiva para a nNOS na “ring fiber”.....	73

Índice de tabelas e figuras_____

Figura 20 - Gráficos da atividade de NOS nas amostras musculares	75
Figura 21 - Imagem de gel de SDS-PAGE mostrando o perfil das <i>MyHCs</i> de cavalos do GS (7 e 9) e do GT (4 e 6).....	78
Figura 22 - Imagem de gel de SDS-PAGE mostrando o perfil das <i>MyHCs</i> de cavalos (3) com a mesma ascendência paterna.....	79

Lista de Abreviat uras

ATP - Adenosina 5' trifosfatodc
ANOVA - Análise de variância
BH₄ - Tetrahidrobiopterina
BSA - albumina de soro bovino
cGMP - Guanosina monofosfato cíclica
CAT - Catalase
CaM - Calmodulina
DNA - Ácido deoxiribonucleico
cDNA - Ácido deoxiribonucleico de fita complementar
DAB - diaminobenzidina
DMSO - Dimetil-sulfóxido
EGTA - Ácido etileno glicol-bis (β -amino éter) N, N, N', N'-tetracético
EPM - Erro padrão da média
ERO - Espécie reativa de oxigênio
EDL - Extensor digital longo
EDTA - Ácido etileno diamino tetracético
eNOS - Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
EDRF - Fator de relaxamento derivado do endotélio
ELISA - Enzymatic-linked immunosorbant assay
FOG - Fast oxidative and glycolytic (fibra rápida oxidativa e glicolítica)
FAD - Flavina Adenina dinucleotídeo
FMN - Flavina mononucleotídeo
FG - Fast glycolytic (fibra rápida glicolítica)
GS - Grupo sedentário
GT - Grupo treinado
GPX - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione reductase
GTP - Guanosina trifosfato
HEPES - Ácido [N-(2-hidroxietil) piperazina N'-(2- etanosulfônico)]
iNOS - Isoforma induzível da óxido nítrico sintase
kDa - Kilo Dalton

Lista de Abreviat uras

L-[U-¹⁴C] citrulina - Citrulina levógira marcada com carbono 14

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil éster

LPS - Lipopolisacarídeo

mtNOS - Isoforma mitocondrial da óxido nítrico sintase

MyHC- Myosin Heavy Chain (cadeia pesada da miosina)

MyHC I - Myosin Heavy Chain do tipo I

MyHC IIa- Myosin Heavy Chain do tipo IIa

MyHC IIb - Myosin Heavy Chain do tipo IIb

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

mATPase - Adenosina trifosfatase miofibrilar

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

nNOS - Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida

NBT - Nitroblue tetrazolium

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

nNOS_μ - “Splicing” alternativo μ da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS_α - “Splicing” alternativo α da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS_β - “Splicing” alternativo β da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

nNOS_γ - “Splicing” alternativo γ da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

NOH-Arg - NG-hidroxi-L-Arginina

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada

nNOS ^{Δ2/Δ2} - Ratos “Knowkout” para a isoforma neuronal da óxido nítrico sintase

NADH-TR - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) tetrazólio redutase

PBS - Phosphate-buffered saline (tampão fosfato salino)

ROS - Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

RNS - Reactive nitrogen species (espécies reativas de nitrogênio)

SDS-PAGE - Sódio dodecyl-sulfate poliacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamina em condições denaturantes – dodecil sulfato de sódio)

SO - Slow oxidative (fibra lenta oxidativa)

SOD - Superóxido dismutase

Lista de Abreviat uras

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TRIS/HCl - Tris-[Hidroximetil] aminometano - ácido clorídrico

Tris - Tris-[Hidroximetil] aminometano

Resumo_____

Em várias espécies de mamíferos o músculo esquelético expressa “splicings” variantes do mRNA da isoforma neuronal da enzima Óxido Nítrico Sintase (nNOS). O músculo esquelético é composto por uma população de fibras musculares metabolicamente heterogêneas. A distribuição destas fibras no músculo esquelético de eqüinos está correlacionada com aptidão atlética destes animais. Investigamos a expressão da nNOS em músculo esquelético eqüino, e analisamos se esta expressão está relacionada à tipologia muscular e ao estado atlético de cavalos treinados para competições de enduro. Biópsias musculares foram removidas, a uma profundidade de 5 cm, do músculo glúteo médio esquerdo de nove cavalos árabes sedentários e nove treinados para enduro. O homogenato das amostras foi analisado quanto ao conteúdo de cadeias pesadas de miosina (*MyHC*), segundo sua mobilidade em gel de eletroforese (SDS-PAGE), e quanto à atividade enzimática de síntese de óxido nítrico. Ainda, através de cortes transversais seriados, as amostras foram submetidas a ensaios histoquímicos para as atividades enzimáticas de adenosina trifosfatase da miosina (mATPase) e da nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR). As amostras foram submetidas também a ensaios imunohistoquímicos para a nNOS. Os dados referentes ao conteúdo relativo dos diferentes tipos de fibras musculares e à expressão da nNOS, foram obtidos através de análise em microscopia óptica, enquanto que, os dados referentes ao conteúdo de *MyHCs* e ao tamanho das fibras musculares foram obtidos através de densitometria e morfometria, respectivamente. Três isoformas de *MyHC* foram identificadas no músculo glúteo médio esquerdo eqüino, a saber, *MyHC I*, *MyHC IIa* e *MyHC IIx*. Os cavalos pertencentes ao grupo treinado (GT), quando comparados

Resumo_____

aos do grupo sedentário (GS), apresentaram maior capacidade oxidativa e maior porcentagem das fibras lentas oxidativas (tipo I) e das fibras rápidas oxidativas e glicolíticas (tipo IIA) e menor porcentagem de fibras rápidas glicolíticas (tipo IIX). Os cavalos treinados apresentaram maiores níveis de expressão e atividade da nNOS, quando comparado com os cavalos sedentários. A localização da nNOS em cavalos sedentários se apresentou restrita a áreas subsarcolemais enquanto que em cavalos treinados a nNOS também foi identificada em áreas citoplasmáticas. A nNOS se apresentou heterogeneamente distribuída entre os diferentes tipos de fibras. Sua expressão foi mais alta nas fibras rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIA do que nas fibras rápidas glicolíticas do tipo IIX e ausentes nas fibras lentas do tipo I. A prática de enduro induziu uma adaptação aeróbia oxidativa, no sentido de rápida para lenta, no músculo esquelético glúteo médio esquerdo de eqüinos e um aumento na expressão da nNOS. Além disto, foi possível demonstrar que a nNOS possui expressão e localização diferenciada no músculo glúteo médio de eqüinos que estão relacionadas com os tipos de fibras musculares e com o estado atlético dos cavalos.

Abstract

Background: Skeletal muscle of many mammalian species is known to express variant splicings of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) isoform. Skeletal muscles are composed of a metabolically heterogeneous population of myofibers, and fiber composition in equine skeletal muscle is correlated to their athletic ability in endurance events. In this study we investigated if nNOS is expressed in equine skeletal muscle according to fiber typing and the athletic performance of endurance-raced horses.

Methods: Biopsy samples from 5 cm depth of the *gluteus medius* muscle of nine sedentary (SH) and nine endurance trained (TH) horses were examined, for myosin heavy chain (*MyHC*) electrophoretic mobility and NOS activity and, using serial cross sections, for myosin adenosine triphosphatase and nicotinamide adenine dinucleotide reductase histochemical activities, and also for immunostaining against nNOS. Data about relative content of the various myofiber types and nNOS expression, were obtained by optical microscopy, while data about relative content of *MHC* and myofiber sizes were collected by densitometry and morphometry, respectively.

Results: Three *MyHC* isoforms, *MyHC I*, *MyHC IIa* and *MyHC IIx*, were identified in the left *gluteus medius* equine skeletal muscle. Endurance-trained horses presented a higher oxidative capacity and a higher percentage and a larger size of slow-aerobic oxidative (type I) and fast-aerobic oxidative (type IIA) and a lower percentage and size of fast-glycolytic, type IIX fibers when compared with those of the sedentary animals. Trained horses presented higher levels of nNOS expression and activity when compared with that of sedentary ones. nNOS in sedentary horses is restricted to the subsarcolemal area while in endurance-trained animals it is also present in

Abstract

cytoplasmic sites. nNOS is heterogeneously distributed among the different myofibers, its expression is higher in fast-oxidative type IIA, then in the fast-glycolytic type IIX myofiber and is absent in slow-twitch type I fibers. The differences encountered between the two groups of horses constitute an expected alteration in muscular typology resulting from an endurance-training program in equines, what validates our analyses about the effects of endurance training on the nNOS expression in equine skeletal muscle using an experimental model with two independent groups of horses.

Conclusion: Endurance training induced a fast to slow (aerobic oxidative) adaptation on *gluteus medius* equine skeletal muscle and an increase in nNOS expression. In addition, muscular nNOS isoform was differently expressed and localized in myofibers according to the fiber typing and the athletic conditioning of the horses.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - *Justificativa*

Um bom desempenho atlético requer adaptações metabólicas compatíveis com a disciplina praticada. Adaptações bioquímicas compatíveis com um bom desempenho atlético, e desejáveis em um atleta, apresentam características geneticamente configuradas, ou induzidas pela prática desportiva.

As características atléticas intrínsecas ou herdadas devem ser observadas no momento em que escolhemos cavalos para a prática de competições de resistência ou de velocidade, pois a influência genética é determinante (Fink *et al.*,1977). Indivíduos com características metabólicas de resistência, quando utilizados na prática desportiva onde a velocidade é fator preponderante, obviamente terão seus desempenhos comprometidos. Uma idêntica inadequação atlética pode ser observada quando um indivíduo com características de velocista for treinado para provas de resistência.

Na bioquímica do exercício a utilização de avaliações qualitativas e quantitativas de marcadores biológicos pode auxiliar na busca de um melhor desempenho atlético humano ou animal. No condicionamento físico o mecanismo de estímulo e resposta é indispensável para a indução de adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas desejáveis e necessárias para a prática saudável e eficiente de qualquer atividade física. Neste mecanismo, a interpretação das respostas fornecidas por eqüinos em treinamento é tradicionalmente delegada a profissionais com diferentes graus de sensibilidade e formação técnica. A confiabilidade

1- Introdução _____

de desta tradução é questionável, pois é subjetiva, e não possui uma padronização. Especialmente quanto à identificação de características intrínsecas de eqüinos atletas, necessitamos de novas tecnologias que nos possibilitem mensurar e comparar características metabólicas individuais. Portanto, um adequado repertório de parâmetros fisiológicos e bioquímicos é indispensável para um melhor diagnóstico da aptidão individual, e para a interpretação das respostas fornecidas por um organismo submetido a um processo de condicionamento físico.

A identificação através de tipagem muscular de características aeróbias individuais de um atleta, como a porcentagem de fibras musculares oxidativas do tipo I, pode servir como parâmetro de seleção. O monitoramento de adaptações metabólicas conhecidamente desejáveis, como uma adequada tipagem muscular, especialmente no caso dos cavalos da raça Puro Sanguê Árabe, que é a raça mais utilizada em competições de enduro em todo o mundo, poderá auxiliar enduristas e profissionais ligados ao esporte, na escolha de um bom cavalo de enduro (Lopez-Rivero., 1992). Rotineiramente a escolha da distância em que um cavalo vai competir e conseqüentemente o seu treinamento, é baseado em critérios subjetivos como fenotipia e genealogia.

Cavalos de competição são submetidos a um alto nível de estresse. Em provas de resistência eqüestre, que podem atingir a distância de até 160 km, a incidência deste estresse é intensa e possui componentes oxidativos, térmicos e mecânicos. O estresse de treinamento é bastante estudado em eqüinos, e é motivo de preocupação cotidiana para os profissionais do desporto eqüino, podendo resultar em baixo desempenho e aumento na susceptibilidade a doenças (Mills *et al.*, 1996 e

1997).

O estresse oxidativo e os efeitos sinalizadores e deletérios de suas reações radicalares sob condições de exercício, já está sendo estudado há algum tempo (Ji LL., 1993). A descoberta na década de 90 da função sinalizadora do óxido nítrico (NO) e sua ligação com o estresse oxidativo, desencadearam um grande interesse na comunidade científica internacional, iniciando-se uma intensa busca por seus possíveis alvos e efeitos metabólicos. A relevância destes estudos pode ser demonstrada pela matéria de capa da revista Science, que concedeu ao “NO” o título de molécula do ano em 1992. Em 1998, o Prêmio Nobel de Medicina foi oferecido aos pesquisadores Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott e Ferid Murad pelo trabalho intitulado “Óxido nítrico como uma molécula sinalizadora no sistema cardiovascular”.

Um recente artigo de revisão (Stamler & Meissner, 2001), discorre sobre os alvos e efeitos do NO no músculo esquelético, e sobre a expressão e localização sub-celular da Óxido Nítrico Sintase (NOS) neste mesmo tecido. Vários alvos e efeitos do NO, bem como várias localizações e interações da NOS, não são ainda entendido/as ou sequer conhecido/as. Em músculo esquelético eqüino, por exemplo, a expressão da NOS ainda não havia sido demonstrada. A figura 1B mostra os resultados de uma revisão bibliografia onde a combinação de palavras chave demonstra a não existência de publicações correlacionando a expressão da NOS no músculo esquelético eqüino com o exercício.

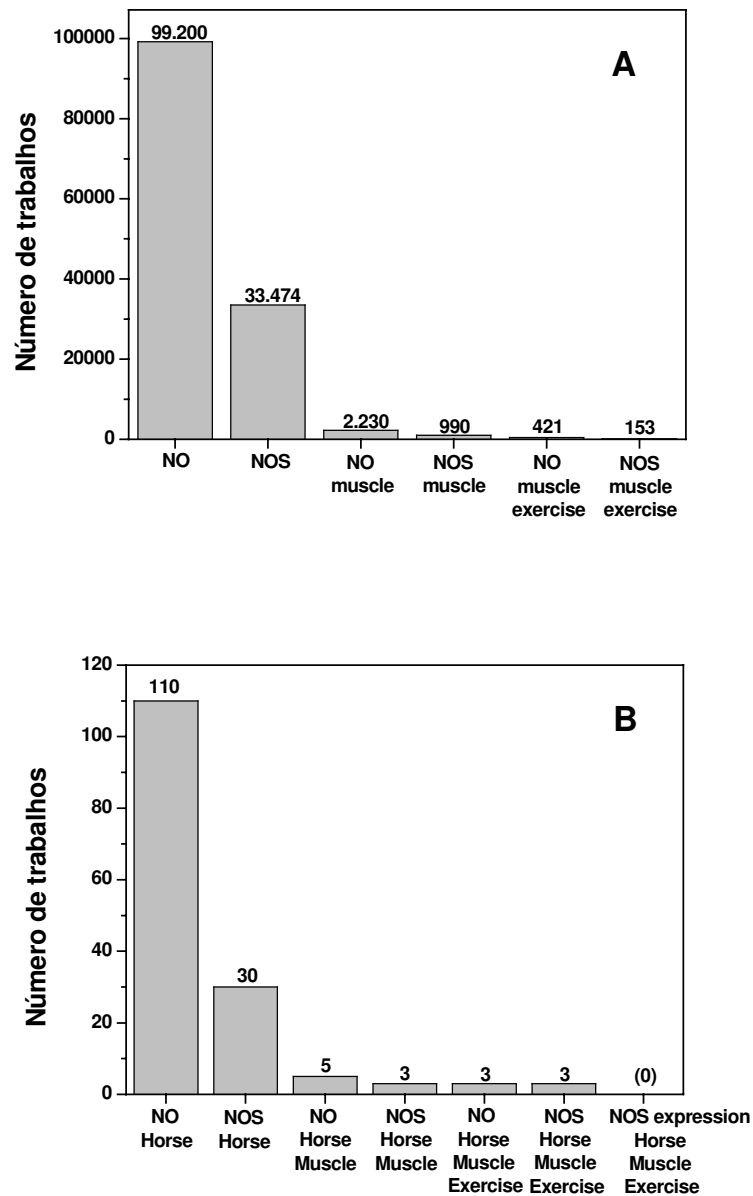


Figura 1 - Gráficos das citações pesquisadas no banco de dados, “Science Citation Index Expanded”, do site “Web of Science” (de 1945-54 até 2004). (A) Número de trabalhos encontrados entre um total de 26.901.573, usando-se as palavras chave NO(S), “muscle” e “exercise”. (B) Número de trabalhos encontrados usando-se as palavras chave NO(S) (“expression”), “horse”, “muscle” e “exercise”.

1- Introdução

Em 1990, de um total de 689.629 artigos indexados, apenas 241 (0,03%) artigos citavam a palavra chave “NO”, enquanto que em 2003 este número subiu para 11.676 (1,05%) artigos de um total de 1.111.377 indexados (“Web of Science”). Comparando-se o número de artigos com a palavra chave “NO” até 2004 acumulados (99200) com o número total de artigos indexados no “Science Citation Index Expanded” até 2004 (26.901.573), encontraremos uma percentagem de 0,37%, que é muito próxima da percentagem de artigos até 2004 publicados, onde a palavra chave “DNA” pode ser encontrada (0,45%).

1.2 - Plasticidade Muscular

O músculo esquelético é um tecido extremamente heterogêneo (Pette & Staron, 1997 e 2001) e possui a capacidade de adaptar-se quando estimulado por diferentes fatores como, variações na atividade contrátil, fornecimento de substrato energético e alterações em fatores ambientais (Flück & Hoppeler, 2003). A interconversão entre os diferentes tipos de fibras é, aparentemente, a indicação desta capacidade de resposta adaptativa (Pette & Staron, 1997). A mais importante alteração molecular no fenótipo das miofibrilas e nas propriedades contráteis do músculo esquelético, quando estimulado pelo treinamento, é a expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina - Myosin Heavy Chain / *MyHC* - (Pette & Staron, 2001). A Figura 2 mostra uma representação esquemática das diferentes estruturas filamentosas e globulares que compõem a molécula de miosina.

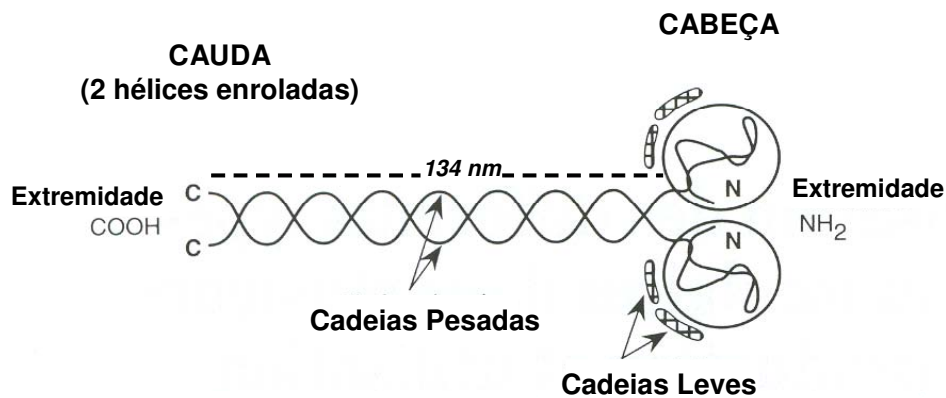


Figura 2 - Modelo da molécula de miosina mostrando as duas cadeias filamentosas que compõem a cauda e as estruturas enoveladas, parte das cadeias pesadas e as duas cadeias leves, que compõem cada cabeça da miosina (Barrey *et al.*, 1995).

Diferenças moleculares resultam em uma diferenciação macroscopicamente visível, onde vários músculos esqueléticos podem ser classificados em músculos brancos e vermelhos. Os músculos vermelhos diferenciam-se dos brancos essencialmente pela alta concentração de ferro hemínico das globinas, especialmente a mioglobina. São músculos ricos em fibras oxidativas que possuem uma grande quantidade de mitocôndrias.

1.2.1 - As Fibras musculares

Os músculos denominados brancos e vermelhos, possuem um conteúdo diferenciado de fibras musculares que determinam estas colorações. Músculos ricos em mitocôndrias apresentam coloração mais avermelhada devido a alta concentração de heme-proteínas. Uma classificação bastante simples destas

fibras musculares está baseada na sua velocidade de contração, que determina uma diferenciação de duas distintas sub-populações de fibras, sendo uma de contração lenta (tipo I) e uma de contração rápida (tipo II). As fibras do tipo I possuem uma velocidade de contração lenta e são capazes de se contrair repetidamente com uma força moderada. Utilizam preferencialmente ácidos graxos como fonte de energia e são muito resistentes à fadiga. Por outro lado, as fibras do tipo II são de contração rápida, com um desenvolvimento de força muito maior. Contudo, as fibras do tipo II possuem baixa resistência à fadiga, e são ricas em glicogênio.

A velocidade máxima de encurtamento de uma única fibra muscular está diretamente relacionada às isoformas de *MyHCs* que nela predominam (Reiser *et al.*, 1985) e à inervação eferente terminal desta fibra (Flück & Hoppeler, 2003). Na fibra de contração lenta do tipo I predomina a *MyHC I*, enquanto que na fibra de contração rápida do tipo II predomina as *MyHCs II*. Em mamíferos foram caracterizados três tipos básicos de fibras musculares. As fibras do tipo I são de contração lenta, oxidativas aeróbias e expressam a *MyHC I*. As fibras do tipo II são subdivididas em IIA, IIB e IIX ou D. As fibras IIA são glicolíticas aeróbias, rápidas, medianamente resistentes à fadiga e expressam a isoforma *MyHC IIa*. As fibras IIB são glicolíticas anaeróbias, rápidas, conseguem sustentar a força por muito pouco tempo e expressam a isoforma *MyHC IIb* (Bar & Pette, 1988; Pette & Staron, 1990; Schiaffino & Reggiani, 1994). Em músculos de ratos e camundongos, e também em lhamas, uma quarta isoforma de *MyHC*, e conseqüentemente um quarto tipo de fibra foi encontrado. A *MyHC IIx* é expressa nestes animais e configura a fibra muscular do tipo IIX que possui características metabólicas e funcionais intermediárias entre

1- Introdução _____

as fibras IIA e IIB. A fibra tipo IIB está relacionada à velocidade intrínseca das espécies de pequeno porte citadas (Winder *et al.*, 1974; Thomason *et al.*, 1986; Schiaffino *et al.*, 1989; Larsson *et al.*, 1991; Chang & Fernandes 1997). A Tabela I mostra os principais tipos de fibras musculares já descritas em músculo esquelético de mamíferos adultos.

Tabela I – Características bioquímicas e metabólicas dos quatro tipos de fibras musculares de mamíferos adultos e distribuição relativa dos substratos metabólicos associados ao exercício.

TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Características Metabólicas	I	IIA	IIX	IIB
Isoforma de Miosina	<i>MyHC I</i>	<i>MyHC IIa</i>	<i>MyHC IIx</i>	<i>MyHC IIb</i>
Velocidade	+	++	+++	++++
Capacidade Oxidativa	++++	+++	++	+
Tamanho	++	++	+++	++++
Fadiga	Resistente	Intermediária	Intermediária	Sensível
Cor	Vermelha	Intermediária	Intermediária	Branca
Glicogênio (substrato)	+	?	?	++++
Lipídeo (substrato)	+++	?	?	?

Extraído de Chang & Fernandes, 1997. (?) indica que a distribuição relativa dos metabólitos ainda não está bem esclarecida e exige maiores investigações.

Uma grande porcentagem de fibras musculares expressa mais de uma isoforma de *MyHC*. Pette & Staron (1997) demonstraram a ocorrência de vários tipos

1- Introdução

intermediários, ou híbridos, de fibras musculares, tais como: IC, IIC, IIAIX e IIXB. Estas fibras correspondem a uma verdadeira especialização individual, essencialmente genética, mas passível de modificações induzidas pela preparação física. Desta forma, o estímulo adequado pode fazer uma fibra muscular, inicialmente adaptada para a contração rápida passar a expressar isoformas de contração lenta, tornando-se de contração lenta, e vice-versa. (Pette & Vrbová, 1992; Rivero *et al.*, 1996b).

A existência de várias isoformas de *MyHC*, significa que as fibras musculares podem alterar suas propriedades em resposta a diferentes estímulos, como o exercício, através da reconstrução das miofibrilas com novas *MyHCs* de atividade mais apropriada para a situação. Porém, mudanças de tipos de fibras são possíveis apenas dentro de uma faixa limitada de adaptabilidade, que é característica para diferentes músculos e espécies.

1.2.2 - Tipagem Muscular

A tipagem de fibras musculares leva em consideração características bioquímicas, histoquímicas e funcionais. As técnicas qualitativas para a atividade enzimática da mATPase (Snow & Guy, 1976), para a NADH diaforase (Dubowitz & Brooke, 1973) e a imunohistoquímica (Rivero *et al.*, 1996a e b) possibilitam com diferentes níveis de precisão, a identificação individualizada de cada tipo de fibra. Além da tipagem das fibras musculares, outras técnicas permitem a quantificação do conteúdo dos diferentes tipos de miosina do tecido muscular. Através da eletroforese

em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e, mais recentemente, do método de ELISA (Barrey *et al.*, 1995), as *MyHCs* podem ser quantificadas. A expressão das *MyHCs* também pode ser estudada através de imunoblotting (Rivero *et al.* 1999) e hibridização “in situ” (Chang *et al.* 1997). Todas estas técnicas constituem um portfólio metodológico para o estudo da plasticidade muscular. Entretanto, cabe aqui mencionar que uma técnica atualmente muito utilizada em estudos de proteoma, a eletroforese em duas dimensões, não é capaz de separar os “spots” de *MyHCs*, devido à limitação desta técnica para proteínas com tão alta massa molecular (~210 KDa).

1.2.3 – Tipagem muscular em eqüinos

A tipagem muscular é uma metodologia que pode ser empregada em cavalos para avaliar as características funcionais geneticamente herdadas, e as adaptações induzidas pelo treinamento (Lopez-Rivero,1992). O músculo glúteo médio foi considerado por alguns pesquisadores como sendo bastante adequado para o estudo da tipologia muscular, pois é um músculo muito recrutado durante exercícios. Sua contração é responsável pela flexão da coxa e consenquentemente pela propulsão do membro posterior eqüino. Portanto, ele está sujeito às inexoráveis interconversões miofibrilares provocadas pelo treinamento (Snow & Guy, 1976). O glúteo médio também possui adequadas concentrações dos três diferentes tipos de fibras musculares puras, sendo assim representativo de todo o espectro de miofibras. Ele também possui uma localização que facilita o acesso cirúrgico, e é utilizado há

décadas como sítio preferencial para extração de amostras musculares para a tipagem de fibras.

No músculo esquelético eqüino (Rivero *et al.* 1996a), como em humanos (Pette & Staron, 1997), ocorrem três tipos de fibras musculares denominadas “puras”. Estas fibras expressam três isoformas de *MyHC* (*MyHC I*, *Ila* e *Ilx*), que foram identificadas pelas suas mobilidades específicas por eletroferese em gel de poliacrilamida (Rivero *et al.*, 1996b) e são denominadas de fibras musculares tipo I, IIA e IIX.

A existência de cinco tipos diferentes de fibras musculares foi demonstrada em tecido muscular esquelético eqüino, através principalmente da reação imunohistoquímica para as *MyHCs* (Rivero *et al.*, 1996a,b) que correspondem às fibras dos tipos I, C, IIA, IIAX e IIX. As fibras dos tipos I, IIA e IIX são puras e as dos tipos C e IIAX são híbridas. As fibras híbridas denominadas tipo C são intermediárias entre as fibras do tipo I e IIA, e as fibras denominadas tipo IIAX são intermediárias entre as fibras IIA e IIX. As fibras tipo C expressam a *MyHC I* e a *MyHC Ila*, e as fibras tipo IIAX expressam a *MyHC Ila* e a *MyHC Ilx* (Barrey *et al.*, 1999; Serrano & Rivero, 2000).

Tabela II – Classificação dos diferentes tipos de fibras musculares identificadas pela técnica de imunohistoquímica no músculo glúteo médio eqüino (Rivero *et al.*, 1996b).

TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES EM EQÜINOS

TIPO	I	C	IIA	IIAX	IIIX
MIOSINA	<i>MyHC I</i>	<i>MyHC I + MyHC IIa</i>	<i>MyHC IIa</i>	<i>MyHC IIa + MyHC IIx</i>	<i>MyHC IIx</i>
CLASSIFICAÇÃO	Pura	Híbrida	Pura	Híbrida	Pura

Portanto, a isoforma *MyHC IIb* não é expressa em tecido muscular eqüino (Rivero, 1995), sendo maior sua ocorrência em animais de pequeno porte. Sua função parece estar relacionada com a velocidade instrínseca da espécie onde ela é expressa. Segundo Rivero e colaboradores (1996b), as fibras denominadas “híbridas” dos tipos C e IIAX estão presentes em músculos que apresentam um processo de interconversão miofibrilar, e representam passos intermediários do intrincado processo de adaptação da plasticidade muscular induzida pelo exercício (Rivero *et al.*, 1997; Pette & Vrborá, 1992).

A técnica de histoquímica para a NADH desidrogenase também tem sido utilizada na tipagem muscular e, em eqüinos, a tipagem por esta técnica corresponde exatamente àquela baseada na atividade de mATPase das isoformas de miosina (Rivero *et al.*, 1995). Assim, as fibras SO (Slow Oxidative) são as que possuem a maior capacidade oxidativa e correspondem às fibras tipo I. As fibras FOG (Fast Oxidative and Glycolytic) são intermediárias, e as FG (Fast Glycolytic) são pouco oxidativas. Entre a subpopulação de fibras FOG podem ser identificadas as

fibras tipo IIAX, que apresentam uma capacidade oxidativa intermediária entre as fibras tipo IIA e tipo IIX.

1.2.3.1 – Fatores que influenciam a tipagem muscular em cavalos

Em várias raças eqüinas já estudadas, indivíduos ainda não treinados e pertencentes ao mesmo grupo racial quando comparados entre si, através de estudos anatomo-funcionais podem evidenciar, do ponto de vista do metabolismo muscular, uma diferenciada aptidão atlética (Barrey, 1994). Cavalos sedentários de uma mesma raça apresentam diferentes proporções relativas de *MyHCs*, que traduzem uma maior adaptabilidade para competições de longa duração e baixa intensidade, possuindo maior concentração relativa de fibras oxidativas aeróbias do tipo I, ou para competições de curta duração e alta intensidade, possuindo maior concentração relativa de fibras glicolíticas anaeróbias do tipo II (Lopez-Rivero, 1992).

Tradicionalmente as raças Puro Sangue Árabe e Quarto de milha são internacionalmente consideradas especialistas em provas de resistência e velocidade, respectivamente (Barrey, 1994). A análise comparativa de diferenças metabólicas e morfológicas relevantes entre diferentes raças eqüinas, e entre diferentes indivíduos de uma mesma raça, deve levar em consideração vários fatores. A padronização das técnicas de coleta de biópsia muscular, bem como do processamento das amostras e das análises laboratoriais é indispensável. A profundidade de coleta deve ser rigorosamente respeitada, pois o músculo é heterogêneo possuindo uma maior concentração de fibras do tipo I no seu interior,

enquanto na superfície do ventre muscular predomina as fibras do tipo II (Serrano *et al.*, 1996) a. Amostras musculares removidas sucessivamente através de biópsia, de um mesmo indivíduo, e em um mesmo sítio de coleta, podem apresentar uma variabilidade de resultados da ordem de 6 a 12% (Rivero *et al.*, 1991).

Os mecanismos de regulação e interação da expressão gênica estão sob intensa investigação, pois, complexas mudanças fenotípicas quanto à composição de miosinas do músculo esquelético, ocorrem nos mamíferos logo após o seu nascimento, e se prolongam por toda a vida. Tanto o avanço da idade quanto o treinamento direcionam uma interconversão no sentido aeróbio, aumentando a concentração de fibras do tipo I e IIA, e diminuindo a concentração de fibras do tipo IIX ou IIB. Os músculos esqueléticos envelhecidos apresentam uma alta proporção de fibras híbridas do tipo C (I+IIA) e do tipo IIAX (IIA+IIIX) (Flück & Hoppeler, 2003).

Quanto à influência do sexo sobre a tipologia muscular, aparentemente apenas as fibras do tipo II apresentam variação (Roneus & Lindholm, 1991; Roneus 1993). As éguas apresentam uma menor proporção de fibras IIA e IIX, uma menor área de secção transversal nas fibras IIA, e uma maior área nas fibras IIX, comparando-se com o músculo glúteo médio de garanhões.

1.2.4 - Treinamento de resistência

Está claramente estabelecido em animais que a ativação de células satélites está envolvida e pode ser um pré-requisito para a hipertrofia das fibras musculares (Schultz & McCormick, 1994). Usando um marcador para células

satélites, foi demonstrado que a precoce expressão de marcadores da miogênese foi ativada em fibras musculares de humanos, em resposta ao treinamento de resistência (Kadi & Thornell, 1999). Acredita-se que células satélites proliferam e se fundem com fibras musculares já existentes, contribuindo para aumentar o número de núcleos destas fibras. Outro estudo indicou que o número de núcleos musculares aumentou em fibras hipertrofiadas, e este aumento apresentou uma correlação positiva com um aumento no número de células satélites (Kadi & Thornell, 2000). Estes resultados são evidências disponíveis de que a aquisição de núcleos adicionais é necessária para dar suporte a um processo de hipertrofia das fibras musculares durante treinamento intenso, e sugere que células satélites são recrutadas durante esta hipertrofia para manter constante a razão citoplasma/núcleo.

Geralmente o treinamento de resistência induz adaptações oxidativas no músculo esquelético de várias espécies de mamíferos, tais como, aumentos na densidade capilar, número de mitocôndrias e acúmulo de glicogênio, provocados por um aumento na distribuição relativa das fibras oxidativas dos tipos I e oxidativas e glicolíticas do tipo IIA, enquanto diminui a de fibras glicolíticas do tipo IIX. Também ocorre uma hipertrofia muscular provocada pelo aumento na expressão de proteínas filamentosas que resulta em um aumento no número de sarcômeros (Pette & Staron, 1997). Fatores que aumentam a atividade neuromuscular ou aumentam a carga de trabalho muscular resultam em uma transição no sentido de rápido para lento nas isoformas protéicas e nos tipos de fibras musculares, enquanto fatores que diminuem a atividade neuromuscular ou diminuem a carga de trabalho muscular, provocam uma adaptação no sentido oposto (lento para rápido). A figura 3 mostra o efeito

1- Introdução

destes fatores sobre o fenótipo muscular.

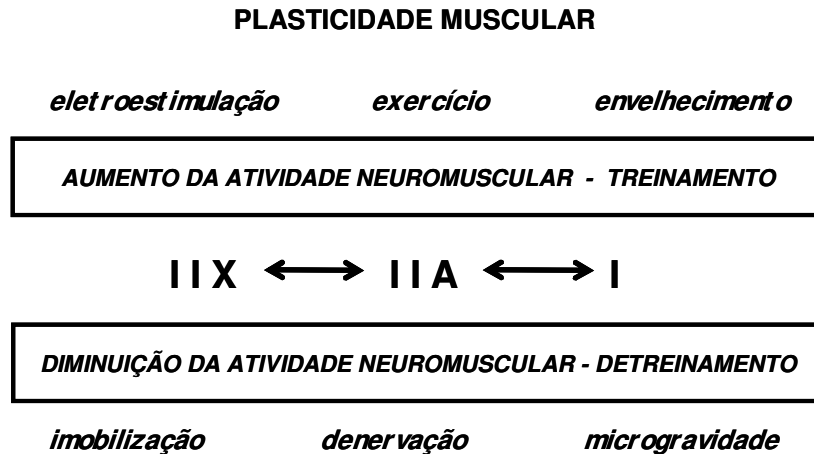


Figura 3 - Esquema representativo dos mais importantes fatores que afetam as transições sequenciais dos tipos de fibras musculares (Modificado de Staron RS. & Pette D., 1997).

1.2.4.1 – *Treinamento de resistência e tipagem muscular em cavalos de enduro*

As adaptações musculares induzidas pela prática de competições de longas distâncias (enduro) envolvem três aspectos essenciais. A mais marcante adaptação metabólica ocorre no metabolismo oxidativo, onde concomitantemente ao aumento no número e tamanho das mitocôndrias, ocorre também um aumento na expressão e na atividade de enzimas do metabolismo energético de vias bioquímicas como glicólise, glicogenólise, ciclo de Krebs, ciclo de Lynen (β -oxidação de ácidos graxos) (Flück & Hoppeler, 2003). Todos os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na captação, transporte e utilização do oxigênio, como concentração de hemáceas e hemoglobina, neovascularização, também são estimulados no exercício

de resistência. Outra adaptação essencial é a capacidade de armazenamento de substratos energéticos. Um grande acúmulo intracelular de glicogênio é um dos aspectos envolvidos na hipertrofia muscular induzida por exercício (Pette & Staron, 2001). Além destas adaptações diretamente envolvidas na função mecano-química de encurtamento do sarcômero, uma adaptação antioxidante também ocorre concomitantemente. O aumento das defesas enzimáticas antioxidantes é fundamental para evitar um ataque radicalar (oxidativo) às estruturas protéicas e membranas biológicas, que inevitavelmente ocorrem concomitantemente ao aumento do consumo de oxigênio pela fibra muscular em condições de exercício.

Todas estas adaptações convergem para a unidade motriz muscular. Portanto, as fibras musculares da musculatura esqueléticas de cavalos de enduro são altamente adaptadas para a oxidação aeróbia dos substratos energéticos disponíveis e necessitam estar morfo-funcionalmente estruturadas para resistir à fadiga induzida por exercício crônico. Neste caso, as fibras musculares geneticamente melhor adaptadas são as fibras puras dos tipos I e IIA, e as fibras híbridas que expressam variadas concentrações destas duas isoformas. Nas fibras musculares onde estas isoformas são expressas, caracterizando assim sua tipologia, todo o metabolismo enzimático destas fibras está melhor adaptado para o exercício de resistência. Portanto, as isoformas de miosina são marcadores moleculares da plasticidade muscular.

Em cavalos, o treinamento de resistência induz a um aumento na expressão de *MyHC I* e *MyHC IIa*, e uma diminuição na expressão de *MyHC IIx* (Rivero *et al.*, 1997 e 2000). Segundo revisão de Pette & Staron (2001), em vários

estudos envolvendo o treinamento de resistência, a maior resposta adaptativa encontrada foi o aumento na atividade das enzimas oxidativas aeróbias responsáveis pelo suprimento energético. Em equinos, exercícios de longas distância e duração em baixa intensidade, resultam em aumento na concentração das fibras lentas oxidativas do tipo I e das fibras rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIA, enquanto as fibras rápidas glicolíticas do tipo IIX diminuem (Rivero *et al.*, 1993 e 2000).

Em cavalos especializados na disciplina de enduro, Rivero e colaboradores (1991), demonstraram uma composição de aproximadamente 30% de fibras tipo I, e 40 a 50% de fibras tipo IIA. Nestes mesmos cavalos um período de seis meses de treinamento foi suficiente para alterar significativamente a proporção de fibras IIA em relação às IIX (Lopez-Rivero *et al.*, 1991). Em cavalos adultos de corrida um treinamento intenso durante duas semanas foi suficiente para provocar alteração na proporção das fibras musculares e na área de secção transversal das fibras. A proporção de fibras tipo IIA aumenta e a de fibras IIX diminui, enquanto as fibras tipo I permanecem inalteradas após o treinamento de duas semanas (Gottlieb & Vedi, 1988).

Sobre influencia de um intenso treinamento de resistência, observa-se geralmente uma hipertrofia muscular provocada tanto pelo aumento no diâmetro das fibras musculares como pelo aumento no número de fibras (hiperplasia). Esta hiperplasia foi descrita em gato e rato (Mikesky *et al.*, 1991, Tamaki *et al.*, 1992). Todas as modificações estruturais são acompanhadas de aumento nas atividades de enzima das vias metabólicas aeróbias.

1.3 - Estresse oxidativo e nitrosativo

1.3.1 - Radicais livres no exercício

Embora a caracterização definitiva do mecanismo de fadiga muscular ainda esteja sob intensa investigação, inúmeras evidências quanto ao envolvimento dos radicais livres neste mecanismo, sugerem que o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas principalmente como consequência do aumento na respiração celular, exerce um importante e controverso papel sobre a contração muscular. Os radicais de nitrogênio (RNs) produzidos por um aumento da atividade da Óxido Nítrico Sintase, sinalizada por um aumento da concentração citosólica de cálcio (Ca^{2+}), também podem contribuir para o desencadeamento de reações radicalares envolvidas na quebra da homeostase intracelular, que podem resultar em disfunção tecidual sob condições de exercício, e consequentemente fadiga muscular (Fitts, 1994; Bredt, 2003).

Em uma situação onde o organismo está produzindo ATP, normalmente cerca de 4 a 5% do oxigênio é parcialmente reduzido, formando superóxidos (Jenkins & Goldfarb, 1993). Um excesso de formação de radicais de oxigênio é denominado estresse oxidativo, e está envolvido no processo de fadiga muscular (Davies *et al.*, 1982). Um excesso de formação de radicais de nitrogênio é denominado estresse nitrosativo e também está envolvido na fadiga e lesão muscular (Stamler & Hausladen, 1998), especialmente pelas estratégicas localizações sub-celulares (especialmente a mitocondrial) da Óxido Nítrico Sintase (Bates *et al.*, 1996), geradora do radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Tanto o estresse

oxidativo, quanto o nitrosativo, provocados pelo exercício físico, são potencialmente deletéreis (Stamler & Hausladen, 1998; Stamler & Meissner, 2001).

1.3.2 - Fontes produtoras de radicais livres no exercício

O exercício físico, entre outros fatores, aumenta o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, esta condição pode levar a um aumento na formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória. O $O_2^{\cdot-}$ produzido na célula é muito instável e se dismuta espontaneamente a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), ou ocorre a catálise enzimática via superóxido dismutase (SOD). Tanto o H_2O_2 como o $O_2^{\cdot-}$ estão correlacionados com a formação de espécies radicalares potentes, entre elas o radical hidroxila ($\cdot OH$), capazes de atacar moléculas biológicas.

O músculo esquelético também produz óxido nítrico ($\cdot NO$), pela reação da enzima óxido nítrico sintase, tendo arginina como substrato (Reid, 1996). O $\cdot NO$ pode reagir com o radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ e formar peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), um intermediário instável, que pode se decompor em um oxidante tão potente quanto o $\cdot OH$ (Mahdavi *et al.*, 1987; Beckman *et al.*, 1990), e é produzido tanto em condições patológicas (Moro *et al.*, 1994), quanto em condições normais, como durante o exercício físico (Esik & Nosek, 1997).

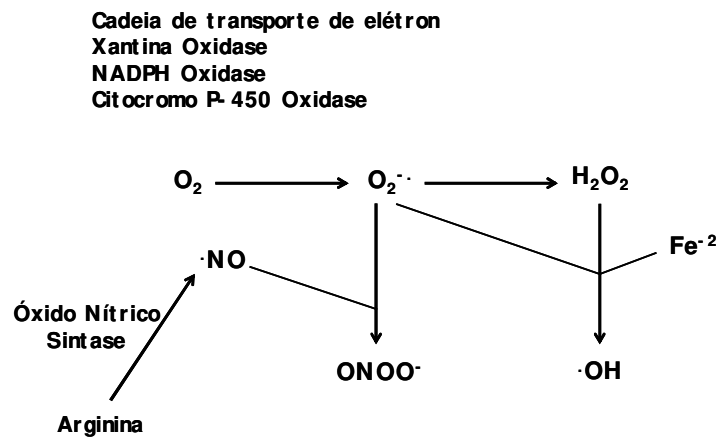


Figura 4 - Vias de formação de EROs e RNs. $\text{O}_2^{\cdot-}$ (radical ânion superóxido); $\cdot\text{OH}$ (Radical hidroxila); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); $\cdot\text{NO}$ (óxido nítrico); ONOO^- (ânion peroxinitrito) (Essig & Nosek, 1997).

Podemos considerar que o peroxinitrito é a molécula que une o estresse oxidativo, provocado pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória, ao estresse nitrosativo, provocado pelo aumento na produção de NO (Figura 4).

Os alvos mais importantes das ROs e RNs são: as membranas celulares e intracelulares, com o início e a propagação da peroxidação lipídica; as proteínas, que sofrem maior ataque proteolítico devido a sua carbonilação; e as moléculas do DNA (nuclear e mitocondrial), com o aparecimento de quebras e/ou ligações cruzadas com proteínas, eventualmente irreversíveis, (Imlay & Linn, 1988; Farber *et al.*, 1990).

1.3.3 - Defesa enzimática antioxidante

Embora fisiologicamente todas as células aeróbias gerem, enzimaticamente ou não, espécies radicalares, as abundantes defesas antioxidantes dos organismos previnem o dano celular causado por EROs. O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR).

1.3.4 - Sistema Óxido Nítrico / Óxido Nítrico Sintase

1.3.4.1 - Óxido Nítrico (NO)

O Óxido Nítrico ($\cdot\text{NO}$) é uma espécie reativa de nitrogênio e uma das menores moléculas sinalizadoras com atividade biológica, pois é relativamente instável e apresenta propriedades que facilitam sua difusão através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos (Mayer & Hemmens, 1997). Apesar de sua baixa reatividade, a difusão do NO é facilitada devida a sua carga neutra em soluções aquosas e sua alta lipofilia (Bredt, 2003). Estas propriedades químicas do NO determinam importantes interações com vários tipos de enzimas e tornam este radical uma molécula potencialmente tóxica. Entretanto, muitas reações químicas do NO com centros redox de proteínas e membranas, anteriormente associadas com efeitos tóxicos deste radical, são atualmente reconhecidas como componentes moleculares de vias de sinalização que controlam diferentes processos como: tônus muscular (musculatura lisa e esquelética), neurotransmissão, angiogênese, proliferação celular (Stamler & Meissner 2001), respiração celular

(Cooper, 2002), apoptose (Sandri *et al.*, 1995), necrose (Rubinstein *et al.*, 1998), e reação contra infecções (MacMicking *et al.*, 1997).

1.3.4.1.1 - A biosíntese de NO

O principal mecanismo de geração de NO em células de mamíferos é através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (EC.1.14.13.39) que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina com a formação concomitante de NO (Tayeh & Marletta, 1989; Pollock *et al.*, 1991). A síntese de NO ocorre através de uma reação em dois passos onde o nitrogênio terminal guanidínico da L-arginina é primeiramente oxidado formando o intermediário, NG-hidroxi-L-arginina (NOH-Arg) e posteriormente, através da oxidação deste, são produzidos NO e L-citrulina (Figura 5). Esta reação ocorre com a participação de co-fatores redox (Leone *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1991; Marletta, 1993; Stuehr, 1997) que são necessários para a atividade da NOS, tais como: (1) NADPH, que é o verdadeiro doador de elétrons da reação; (2) FAD e FMN, cofatores que canalizam os elétrons do NADPH para o grupamento heme, onde o ferro reduzido pela transferência de um elétron vindo do NADPH se liga ao oxigênio molecular, que é então clivado, liberando um átomo de oxigênio como água, sendo o outro incorporado em um dos nitrogênios guanidínicos terminais da arginina para produzir o intermediário NOH-Arg; em seguida, a ativação de outra molécula de oxigênio facilita a oxidação do NOH-Arg, produzindo água, NO e L-citrulina; (4) calmodulina (CaM), que tem o papel de desencadear a transferência de elétrons das flavinas para o grupo heme e finalmente

(5) tetrahidrobiopterina (BH_4), com função ainda pouco esclarecida, mas de grande importância para a catálise da reação de síntese de NO a partir da L-arginina. Na ausência desse co-fator, alguns produtos tais como ânion nitroxila (NO^-) e L-citrulina podem ser formados pela NOS, mas somente com a adição de substratos como NOH-Arg e NADPH (Rusche *et al.*, 1998).

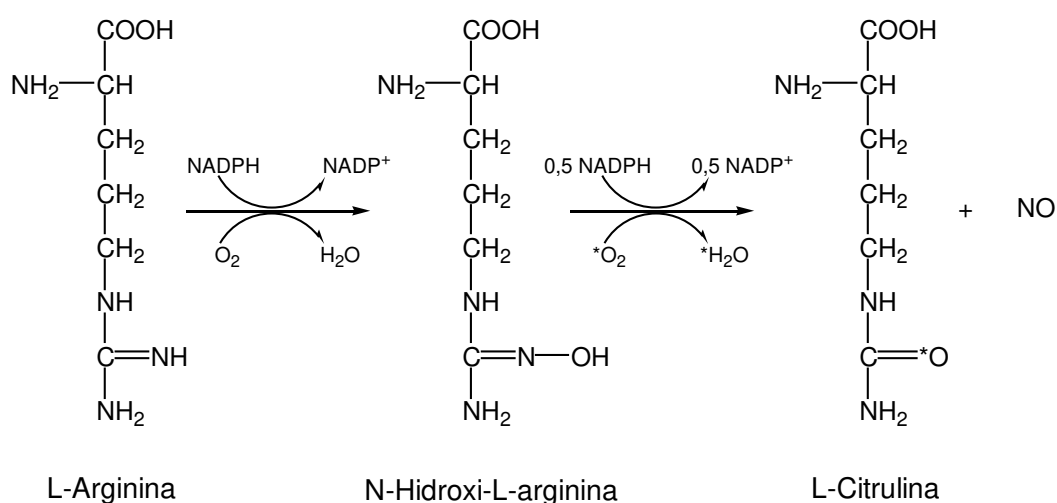


Figura 5 – Reação de formação do radical óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).

1.3.4.1.2 - Ações e alvos do NO

Várias ações fisiológicas do NO (vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão) são mediadas por alterações nos níveis de cGMP, devido à ativação da guanilato ciclase, provocada pela ligação do NO ao grupo heme desta enzima (Moncada *et al.*, 1991; Griffith & Stuehr, 1995). A ativação da guanilato

ciclase celular parece ser a principal função sinalizadora do NO. A guanilato ciclase converte GTP em guanosina monofosfato cíclica (cGMP) que é o segundo mensageiro celular na via de sinalização do NO (Stamler & Meissner, 2001). Uma das ações conhecidas do cGMP, está ligada ao funcionamento de canais iônicos e à regulação de uma classe específica de fosfodiesterases. No entanto, a maioria dos alvos das Proteínas G Quinase ainda são desconhecidos (Stamler & Meissner, 2001).

As respostas biológicas do NO são mediadas através de nitrosilação de centros redox de cisteína ou através de coordenação com heme, Ferro ou Cobre. O NO é capaz de formar complexos com proteínas que contêm grupamentos heme como, Hemoglobina, Mioglobina, Citocromo C, além da guanilato ciclase (Christopherson & Bredt, 1997). A S-nitrosilação também foi identificada em receptores, enzimas, fatores de transcrição e em proteínas G pequenas (Stamler *et al.*, 1997).

O NO foi identificado primeiramente como um fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF-endothelium-derived relaxing factor), que atua como uma molécula sinalizadora, nitrosilando e alterando o estado redox de muitas proteínas regulatórias e enzimas constituintes de inúmeros tecidos, incluindo músculos cardíacos e esqueléticos (Stamler & Meissner, 2001; Bredt, 2003). Uma alta liberação de NO resulta em um alto nível de S-nitrosilação de muitos tipos de biomoléculas envolvidas em processos fisiológicos e fisiopatológicos (Foster, 2003).

Altas concentrações de NO provocam modificações nitrosativas que, como as oxidativas, possuem atividades ambíguas, agindo como sinalizadores

ligados ao estado redox de moléculas, e também como indutores de lesões protéicas (Stamler *et al.*, 1992). Sob condição de estresse nitrosativo, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aconitase e o complexo I da cadeia respiratória são considerados alvos do NO (Stamler., 1994). Em altas concentrações o NO é também capaz de estimular as ciclo-oxigenases (ligando-se ao grupamento hemínico destas enzimas) com subsequente aumento na síntese de prostaglandinas (Stadler *et al.*, 1993, Salvemini *et al.*, 1993).

Também em altas concentrações, o NO pode ter um efeito benéfico impedindo o crescimento de células tumorais, ao inibir a atividade da NADH:ubiquinona oxidoreductase e da cis-aconitase ao interagir com o grupamento heme destas enzimas (Christopherson & Bredt, 1997).

O NO ao reagir com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), causa rápida oxidação de grupos sulfidrilas e tioésteres, bem como nitração e hidroxilação de compostos aromáticos como tirosina e triptofano (Beckman & Koppenol, 1996). Sua produção ocorre em várias condições patológicas como inflamação crônica e aguda, reperfusão de órgãos isquêmicos, entre outras (Moro *et al.*, 1994). Como todo radical livre, o NO também pode causar injúrias ao DNA provocando a quebra de fitas únicas com subsequente ativação da enzima de reparo do DNA, a poli-ADP ribosil transferase (Szabó & Oshima., 1997). A ativação desta enzima rapidamente reduz a concentração celular de seu substrato, o NAD^+ , diminuindo a velocidade da glicólise, o transporte de elétrons e, como consequência, a formação de ATP, resultando na disfunção e morte celulares. Além disto, o dano

persistente ao DNA (que ocorre, por exemplo, na inflamação crônica) pode aumentar a taxa de mutagênese e o risco de câncer (Kröncke *et al.*, 1997).

O NO compete com o oxigênio, ligando-se reversivelmente ao grupo heme da citocromo-C oxidase, conseqüentemente, inibindo a respiração celular (Stamler *et al.*, 1997).

Um outro efeito paradoxal do NO, que ainda está sob intensa discussão, é uma ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (Paxinou *et al.*, 1998). Postula-se que a reação do radical ânion superóxido com o NO, produzindo peroxinitrito, evita a formação do radical hidroxila, a mais reativa espécie de oxigênio (Silveira *et al.*, 2003).

Silveira e colaboradores (2003) demonstraram em experimentos de eletroestimulação de fibras musculares isoladas, que grandes quantidades de NO e peróxido de hidrogênio são produzidas durante o exercício. Entretanto, a membrana plasmática é permeável a estas duas substâncias, ocorrendo nestas condições um grande efluxo de ambos (NO e H₂O₂) para o exterior da célula, evitando a formação intracelular do radical hidroxila e de peroxinitrito.

1.3.4.1.3 - Ações e alvos do NO no músculo

Nos últimos cinco anos as pesquisas realizadas em músculo esquelético evidenciam o surgimento de um paradigma relacionado às ações do NO no músculo (Stamler & Meissner, 2001). Sua função de sinalizador biológico está intimamente ligada ao estado redox de inúmeras proteínas com as quais ele (NO)

reage (Stamler, 1999). Suas ações deletérias ou sinalizadoras e seus efeitos inibitórios ou estimulatórios, dependem de suas concentrações celulares, no primeiro caso, e da localização subcelular e interações das isoformas de NOS com outras proteínas, como por exemplo: caveolina (Feron *et al.*, 1998), sintrofina e dystrophina (Brenman *et al.*, 1996), receptores de ryanodina e canais de cálcio (Xu, 1998), no segundo caso.

No músculo esquelético, além da ação do NO mediada pela ativação da guanilato ciclase, aumentando os níveis de cGMP, a ligação da NOS nos receptores de ryanodina dos canais de liberação de cálcio também está diretamente relacionada, “in vivo”, com a fisiologia da contração muscular (Eu *et al.*, 2000). A S-nitrosilação destes canais liberadores de cálcio, aumenta a probabilidade de sua abertura, enquanto a denitrosilação diminui (Eu *et al.*, 2000). Estes mesmos autores também demonstraram que vários liberadores de NO alteram reversivelmente a função destes canais.

A atividade enzimática da guanilato ciclase e conseqüentemente as concentrações de cGMP do músculo são baixas em relação a outros tecidos (Katsuki *et al.*, 1977). Um aumento de sua produção no músculo sugere um fino ajuste regulatório de algumas vias metabólicas, tal como, aumento da glicólise via aumento de cGMP induzido pela ação contrátil (Stamler, 1999). Entretanto, os mecanismos de ação do cGMP no músculo, ainda não estão bem esclarecidos (Stamler & Meissner., 2001). Kobzik e colaboradores (1994) determinaram a co-localização do NO e do cGMP nas proximidades da sarcolema, levantando evidências quanto à ação de

ambos na fibra muscular. Chao e colaboradores (1997) demonstraram que a inibição da produção de cGMP, está envolvida na inibição da produção de força.

A deficiência ou ausência de expressão da NOS pode acarretar patologias hereditárias. Camundongos da linhagem *mdx*, que são portadores de deficiência de expressão da distrofina, apresentam uma distrofia músculo-esquelética que compromete a atividade física (Chao *et al.*, 1996). Neste animais, a ausência da distrofina impede a ligação na nNOS à sarcolema. Em experimento onde camundongos normais e distróficos foram submetidos a eletroestimulação, a concentração intramuscular de cGMP aumentou 250% nos normais, enquanto nenhum aumento ocorreu em camundongos *mdx* (Lau *et al.*, 1998).

Perkins e colaboradores (1997), também demonstraram que músculo tratado com liberadores de NO teve inibida a formação das pontes cruzadas entre actina e miosina, evidenciando a ação do NO no mecanismo de contração muscular.

A citocromo-C oxidase, a creatina quinase e a ATPase de cálcio de retículo sarcoplasmático, estão sendo bastante estudadas como alvos do NO (Stamler & Meissner., 2001). Experimento utilizando ratos exercitados a uma intensidade 40 a 50 % da intensidade máxima, demonstrou através de “imunoblotting” usando anticorpos anti-nitrotirosina, um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas e concomitante inibição da ATPase de Cálcio (Klebl *et al.*, 1998). Segundo estes autores a nitrotirosina pode estar envolvida na inativação da ATPase de cálcio. Também em ratos, a Creatina Quinase foi inibida por S-nitrosilação, o que também poderia levar à inibição da ATPase de Cálcio (Wolosker *et al.*, 1996).

Um dos mais importantes efeitos do NO no músculo esquelético, especialmente sob condições de exercício, é a redução da força de contração muscular (Stamler & Meissner, 2001). Kobzik e colaboradores (1994), também atribuíram à nNOS o efeito de limitar a geração de força durante contrações musculares esqueléticas. Grandes quantidades de NO liberadas durante a contração muscular podem suprimir a contração isométrica e provocar relaxamento (Balon e Nadler 1994). Paradoxalmente, Wang e colaboradores (2001) descreveram, em ratos, uma progressiva e severa redução na velocidade de deslocamento quando a NOS foi inibida por L-NAME, um análogo da L-arginina. Em atletas humanos a administração de um doador de NO resultou em aumento da força de contração voluntária (Folland *et al.* 2000). As exatas implicações da liberação de NO e seus efeitos sobre diferentes condições de exercício, ainda estão sob intensa e controversa discussão. Em artigo recente Cooper (2002) questiona se o NO seria substrato, inibidor ou efector da citocromo-C oxidase. Neste trabalho fica evidente uma interferência do estado redox intracelular sobre a atividade de catálise desta enzima, podendo resultar em diferentes produtos sobre diferentes estados redox.

Em músculo cardíaco, uma poli S-nitrosilação dos receptores de rianodina dos canais de cálcio provocam uma abertura reversível destes canais, enquanto que uma excessiva S-nitrosilação destes receptores provocam uma abertura irreversível (Stamler *et al.*, 1999). Neste mesmo trabalho, ficou demonstrado que os canais iônicos diferenciam sinais nitrosativos de oxidativos (Stamler *et al.*, 1999).

Outras funções que têm sido atribuídas ao NO produzido pela nNOS de

fibras musculares são: ativação da captação de glicose (Kapur *et al.*, 1997; ; Young *et al.*, 1997); inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Mohr *et al.*, 1996); inibição da captação de oxigênio (King *et al.*, 1994) e inibição da respiração mitocondrial (Cleeter *et al.* 1994).

Além dos efeitos já citados do NO liberado pelas fibras musculares durante a contração, um outro hipotético efeito é explicado pela vasodilatação que ele provoca, quando a contração muscular voluntária está aumentada. Esta vasodilatação protegeria as fibras musculares contra uma isquemia local induzida por uma vasoconstrição de origem simpática, provocada pelo aumento no estímulo nervoso contrátil (Rando, 2001).

Interessantes resultados descritos por Lau e colaboradores (2000), usando camundongos "knockout" para a nNOS (camundongos nNOS $\Delta 2/\Delta 2$) submetidos a um protocolo de estimulação elétrica, mostraram um moderado aumento nos níveis de cGMP no músculo esquelético de contração rápida extensor digital longo, enquanto nenhuma alteração foi encontrada no músculo esquelético sóleo. Estes dados sugerem que, em músculos considerados de contração rápida, onde predominam fibras do tipo II, uma ativação sarcolemal da nNOS pode resultar em um aumento na síntese de cGMP e relaxamento da musculatura lisa vascular. Isto pode ser uma evidência de um intrigante papel do sistema NO/NOS na hiperemia induzida pelo exercício (Bredt, 2003). Uma redução na atividade da nNOS em fibras e em músculos de contração rápida pode diminuir a perfusão arterial e pode promover degeneração seletiva destas células. Este papel do sistema NO/NOS também pode ser muito importante na patogênese da distrofia muscular (Rando,

2001) e presumivelmente na miopatia induzida pelo exercício (Bredt, 2003).

1.3.4.1.4 - Ativação de células satélites pelo NO

A ativação das células satélites é um fator de iniciação do processo de reparo de lesão muscular, promovido por células precursoras quiescentes presentes nas fibras musculares. Observações realizadas sobre a diminuição da atividade da nNOS em camundongos mutantes (camundongos *mdx*), a ausência de distrofina ou de parte deste complexo protéico e inibidores farmacológicos de células satélites, levaram à elaboração da hipótese do envolvimento da liberação do NO pelas fibras musculares na ativação das células satélites e na reparação da lesão muscular (Anderson & Pilipowicz, 2002). Resultados obtidos em cultura de fibras musculares sugerem que a ativação das células satélites é mediada via fibras “maduras”. A regulação da ativação de células satélites aparenta ser um promissor método terapêutico (Anderson & Pilipowicz, 2002).

1.3.4.2 - Óxido Nítrico Sintase (NOS)

A NOS é uma proteína dimérica e o monômero de suas isoformas possui massa molecular que varia de 135 a 164 kDa. Três isoformas distintas de NOS de mamíferos foram purificadas e clonadas, e representam os produtos de três genes distintos (Nathan & Xie, 1994). Estas enzimas são designadas nNOS, iNOS e eNOS de acordo com as células teciduais nas quais elas foram originariamente

descobertas (neurônios, macrófagos e células endoteliais, respectivamente) (Förstermann *et al.*, 1991). Entretanto, verificou-se posteriormente que as três isoformas de NOS são amplamente distribuídas em tecidos de mamíferos (Michel & Feron, 1997) e que um "splicing" variante da nNOS (nNOS μ) é especificamente expresso em músculos esquelético e cardíaco (Silvagno *et al.*, 1996).

Com o objetivo de evitar confusão na nomenclatura, Förstermann e colaboradores (1991) propuseram uma classificação numérica para as diferentes isoformas de NOS, baseada na ordem histórica de purificação e isolamento dos cDNAs das diferentes isoformas.

A isoforma I (NOS I) é Ca²⁺-dependente, constitutivamente expressa no sistema nervoso central e periférico, tendo sido inicialmente purificada de cerebelo de rato e porco (Bredt & Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). A NOS I cerebral é normalmente solúvel e migra com uma massa molecular de 150-160 kDa em gel de eletroforese de SDS-poliacrilamida (Bredt & Snyder, 1990; Schimidt *et al.*, 1991). O NO produzido por esta isoforma tem um importante papel fisiológico como neurotransmissor, participando na gênese da memória e na regulação do fluxo sanguíneo no cérebro (Moncada *et al.*, 1991; Christopherson & Bredt, 1997). Por outro lado, a excessiva produção de NO pela NOS I pode provocar injúria neuronal durante o derrame, a neurodegeneração aguda e crônica e o ataque epiléptico (Bredt & Snyder, 1994; Garthwaite & Boulton, 1995).

A NOS II originalmente descoberta em macrófagos é encontrada normalmente em condições patológicas, produzindo altas concentrações de NO, representando um componente importante na atividade antimicrobial e

antineoplástica destas células. Dependendo da espécie, a atividade da NOS II é grandemente ou completamente independente de Ca^{2+} . Sua expressão é induzida por agentes como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e citocinas (interferon- γ , entre outras), em quase qualquer tipo de célula (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie. *et al.*, 1993). Algumas células podem expressar a NOS II constitutivamente (Gath *et al.*, 1996). Assim como a isoforma I, a NOS-II é predominantemente uma enzima solúvel (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991). Em gel de eletroforese SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), a enzima purificada, a partir de macrófagos induzidos de camundongos, migra com uma massa molecular de 125-135 kDa (Stuehr *et al.*, 1991; Hevel *et al.*, 1991).

A terceira isoforma, NOS III, é Ca^{2+} -dependente e constitutivamente expressa em células endoteliais. Esta isoforma purificada a partir de células endoteliais de aorta de boi, nativas ou mantidas em cultura, apresenta uma massa molecular de 135 kDa em SDS-PAGE (Pollock *et al.*, 1991). Diferentemente das outras isoformas, a NOS-III é mais do que 90% particulada (Försterman *et al.*, 1991) sendo que a miristoilação da glicina N-terminal é responsável pela associação desta isoforma à membrana (Pollock *et al.*, 1992). O NO produzido pela NOS endotelial está envolvido na regulação da pressão sangüínea, na distribuição do fluxo sangüíneo para os órgãos e na inibição da agregação e adesão plaquetárias (Moncada *et al.*, 1997). A produção diminuída de NO pelo endotélio vascular tem sido implicada na fisiopatologia do diabetes, na hemorragia subaracnóide, na injúria que ocorre na reperfusão de órgãos isquêmicos e no aneurisma vascular (Vane, 1994; Harrison, 1997).

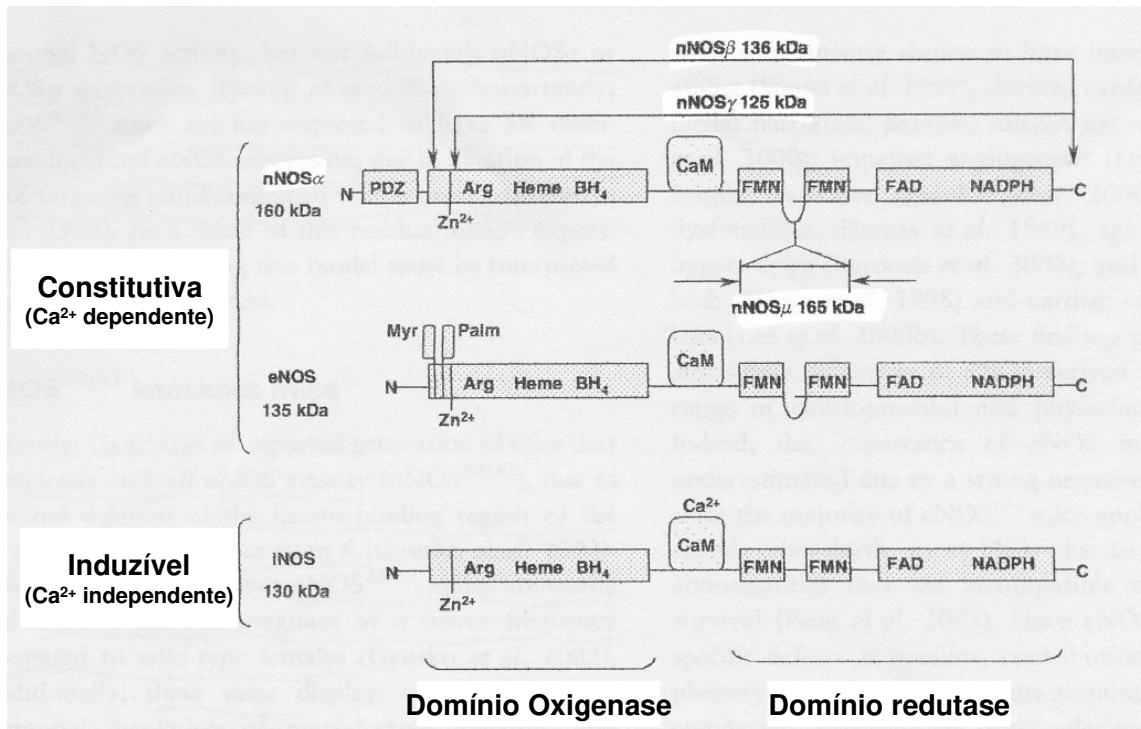


Figura 6 - Estrutura das isoformas e "splicings" alternativos da NOS mostrando seus domínios. (Mungrue *et al.*, 2003).

1.3.4.2.1 - Expressão da nNOS e de seus "splicings" alternativos

A isoforma neuronal da NOS (nNOS ou NOS I) é expressa em tecido nervoso, tanto em neurônios adultos (Cork *et al.*, 1998) como em neurônios em desenvolvimento (Bredt & Snyder, 1994b) e acumula-se na junção neuromuscular de músculo esquelético de humanos e ratos (Yang *et al.*, 1997). Células (fibras) musculares também expressam nNOS. Miócitos cardíacos (Xu *et al.*, 1999), miócitos esqueléticos (Kobzik *et al.*, 1994), e a adventícia de um subconjunto de vasos sanguíneos neuronais (Nozaki *et al.*, 1993) mostraram expressar nNOS.

O estudo da expressão e localização sub-celular da nNOS é bastante complicado devido a ocorrência dos quatro “splicings” alternativos no mRNA da nNOS (Figura 6) que determinam a síntese de quatro peptídeos diferentes (Wang *et al.*, 1999). nNOS α e nNOS μ possuem o domínio PDZ que ancoram estes “splicings” alternativos em estruturas sub-celulares específicas (membranas biológicas). A expressão da nNOS μ foi principalmente demonstrada ligada à sarcolema (Silvagno *et al.*, 1996). A nNOS α foi localizada em mitocôndrias e portanto também é denominada de mtNOS (Elfering *et al.*, 2002). Dois outros splicings são expressos no citoplasma, a nNOS β e a nNOS γ (Mungrue *et al.*, 2003).

1.3.4.2.2 - Regulação da atividade da NOS.

Devido ao fato de ser o NO um radical gasoso e com alta capacidade de difusão, sua formação deve ser rigorosamente controlada para que haja especificidade em sua sinalização. Sobre este aspecto, a família de enzimas sintetizadoras de NO realmente dispõem de uma grande variedade de mecanismos regulatórios, incluindo interações com proteínas e modificações transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais que controlam a biossíntese de NO (Stamler & Meissner, 2001; Bredt, 2003).

A iNOS é tipicamente regulada (estimulada) por citocinas, através de mecanismos transcricionais, assim como as citocinas também estimulam a nNOS e a eNOS no músculo esquelético (Endo *et al.*, 1994). Todas as isoformas de NOS também podem sofrer regulação transcricional por hipóxia (Stamler & Meissner,

2001). A regulação por hipóxia em músculo esquelético envolve um mecanismo fisiológico bastante conhecido como indutor de ataque oxidativo, a isquemia/reperfusão (Vane, 1994; Harrison, 1997). No exercício físico anaeróbio, onde a produção de radicais é comprovadamente aumentada (Alessio & Goldfaber, 1988), seções repetitivas de exercício agudo, seguidas de intervalos regulares, constituem um estado metabólico onde ocorre hipóxia/reperfusão. Este tipo de exercício é conhecido como treinamento intervalado e é bastante utilizado na prática desportiva. Tidball e colaboradores (1998), demonstraram que a eNOS, vascular e muscular, também aumentam com o exercício crônico.

Nas cavéolas sarcoplasmáticas, a eNOS é modificada através miristoilação em um mecanismo de co-tradução e por palmitoilação em um mecanismo de pós-tradução (Sasa, 1997). A expressão da nNOS apresenta-se aumentada na lesão muscular (Rubinstein *et al.*, 1998), no envelhecimento (Capanni *et al.*, 1998), e na atividade muscular (Balon & Nadler, 1997) e diminui em músculo denervado (Tews *et al.*, 1997). Algumas proteínas como a PIN (Jaffrey & Snyder, 1996) e a CAPON (Jaffrey *et al.*, 1998) são inibidoras endógenas da nNOS e são altamente expressas em músculo esquelético (Guo *et al.*, 1999).

1.3.4.3 - NO/NOS na lesão muscular

O NO e os produtos derivados de sua oxidação, quando produzidos em alta concentração pela iNOS, estão implicados na fisiopatologia de vários processos inflamatórios e doenças degenerativas. O envolvimento do NO na lesão muscular e

na fadiga, ainda não está bem esclarecido. Durante um processo inflamatório muscular um aumento tardio na atividade da iNOS, quando associado a um prévio aumento da atividade da nNOS, causa um devastador efeito sobre o músculo e contribui para a rabdomiólise (Rubinstein *et al.* 1998). Um concomitante aumento na expressão da eNOS também ocorre sob estas circunstâncias. Ainda não está esclarecido se este aumento na expressão da eNOS é benéfico ou deletéril. Um aumento na perfusão capilar é desejável para a manutenção da viabilidade tecidual, mas por outro lado, provoca edema. Apesar destas controvérsias, o envolvimento de todas as isoformas de NOS no processo inflamatório muscular é bastante evidente (Stamler & Meissner, 2001). A Figura 7 mostra o efeito do NO liberado durante a contração muscular sobre o endotélio dos vasos capilares.

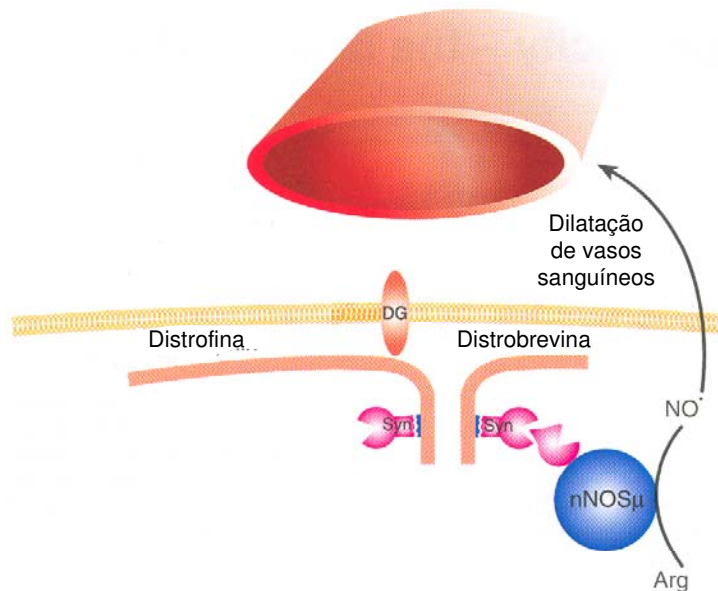


Figura 7 - NO liberado pelas fibras musculares aumenta o fluxo sanguíneo para o músculo em contração. Localização subcelular da nNOS μ ancorada à membrana sarcoplasmática através do complexo distrofina/sintrofina. A distrofina liga-se a sarcolema através de uma glicoproteína (dístroglicano) (Bredt, 2003).

Uma excessiva produção de espécies reativas de nitrogênio está relacionada à fadiga e à lesão muscular. Por outro lado, infusões de SNAC, um doador de NO, protegeu o músculo esquelético contra danos provocados pela isquemia-reperfusão (Stamler & Meissner, 2001). Paradoxalmente, Chen e colaboradores (1998), demonstraram que a infusão de SNAC protegeu as funções contráteis do músculo EDL de rato apresentando lesão por perfusão. Microscopia eletrônica deste músculo revelou que severo inchamento mitocondrial e degeneração causada pela isquemia-reperfusão foram significativamente atenuados após infusão de SNAC. Em um outro experimento uma infusão de L-arginina provocou um aumento na formação de NO e bloqueou a formação do radical ânion superóxido (Huk *et al.* 1997). Estes dados sugerem que um aumento na produção de NO pode proteger o músculo de danos provocados pela isquemia-reperfusão. Concluindo, a preservação da microcirculação, que pode ser colapsada pelo edema, e a indução de uma neovascularização, através do efeito angiogênico do NO, podem ser fatores determinantes na recuperação da lesão muscular. Neste caso, um avanço terapêutico poderia ser uma suplementação na atividade da eNOS pela infusão de L-arginina, provocando uma adequada irrigação sanguínea, e uma concomitante utilização de um inibidor específico para a nNOS, evitando as consequências indesejáveis de um edema (Stamler & Meissner, 2001).

1.3.4.4 - NO e NOS no exercício

Sob condições de exercício, Vassilakopoulos e colaboradores (2003)

demonstraram um grande aumento (400%) na atividade da NOS, induzido por um protocolo de treinamento de resistência aplicado em ratos. A estimulação elétrica crônica em coelhos, também aumentou a expressão da nNOS (Reiser *et al.*, 1997). Por outro lado, Frandsen e colaboradores (2000), depois da aplicação de um protocolo de resistência de seis semanas em atletas humanos, não encontraram nenhuma mudança na expressão da nNOS.

Embora nenhum trabalho tenha sido encontrado na literatura relatando a expressão da NOS em eqüinos, Mills e colaboradores (1996) mostraram em cavalos de corrida (Puro Sangue Inglês) uma redução na velocidade máxima, quando uma perfusão intravenosa de L-NAME foi aplicada. Boffi e colaboradores (2002) mostraram sob condições experimentais (cavalos correndo sobre esteira rolante), que o exercício exaustivo aumentou a produção e liberação de radicais livres de oxigênio e induziu a apoptose em fibras musculares.

1.3.4.5 - Óxido Nítrico Sintase e Tipagem Muscular

Algumas investigações demonstraram, em ratos e camundongos, uma expressão da nNOS tanto exclusivamente (Kobzik *et al.*, 1994) como predominantemente (Grozdanovic *et al.*, 1995; Hussain *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1997; Chao *et al.*, 1998) restrita às fibras musculares de contração rápida do tipo II. Em humanos, a nNOS é aparentemente expressa em ambas as fibras musculares, tipo I e II (Grozdanovic *et al.*, 1997). No entanto, no músculo *vastus lateralis* de humano, a nNOS é aparentemente restrita às fibras lentas oxidativas do tipo I

(Kobzik *et al.*, 1995; Frandsen *et al.*, 2000). Entretanto, a análise de imagens de reação histoquímica para a NADH diaforase mostrou em roedores que uma atividade específica na sarcolema (Planitzer *et al.*, 2001) é significativamente mais alta em fibras de contração rápida oxidativas e glicolíticas do tipo IIA do que em fibras lentas oxidativas do tipo I (Grozdanovic *et al.*, 2001). Resultado diferente também foi obtido por Kobzik e colaboradores (1995) e Frandsen e colaboradores (2000), que encontraram no músculo *vastus lateralis* de humanos, uma expressão da nNOS aparentemente restrita às fibras lentas oxidativas do tipo I. Porém, outros pesquisadores (Gath *et al.*, 1996; Tews *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 1999) não encontraram nenhuma expressão preferencial da nNOS em um subtipo específico de fibra muscular, mas, uma distribuição quase onipresente em fibras músculo-esqueléticas. A exata correlação entre a expressão muscular das isoformas de NOS e a tipologia das fibras musculares, ainda não está bem definida (Stamler & Meissner, 2001) e uma específica caracterização da nNOS quanto à sua expressão nos diferentes tipos de fibras musculares, também ainda apresenta muita controvérsia.

Embora a compartimentalização específica da nNOS em músculo esquelético possa variar entre diferentes espécies, estas variações também podem ser explicadas pelos diferentes estados de condicionamento muscular que sabidamente podem alterar a composição de miofibrilas do músculo.

OBJETI VOS

2 - OBJETIVOS

O presente estudo foi realizado com o objetivo de analisar as diferenças encontradas na expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina e compará-las com distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares no músculo glúteo médio de cavalos sedentários e treinados para competições de resistência (enduro). Além disso, em vista da falta de informação na literatura sobre as correlações entre a expressão da enzima NOS e a tipagem muscular em eqüinos, procurou-se demonstrar a expressão da isoforma neuronal da Óxido Nítrico Sintase (nNOS) em músculo esquelético eqüino, e analisou-se como esta expressão é distribuída entre os diferentes tipos de fibras musculares. Também comparou-se esta expressão com a tipagem de fibras musculares pelas técnicas histoquímicas para a mATPase e NADH desidrogenase, procurando demonstrar que o treinamento de resistência pode induzir mudanças na expressão da nNOS.

***MATERIAIS
E
MÉTODOS***

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Dezoito cavalos árabes clinicamente sadios, separados em dois grupos, foram analisados no presente estudo. O primeiro grupo foi formado por nove cavalos sedentários (grupo GS), machos castrados e fêmeas de 4 a 10 anos de idade. O segundo grupo foi formado por nove cavalos treinados (grupo GT) para competições de enduro, machos castrados e fêmeas de 6 a 11 anos de idade. Os cavalos pertencentes ao grupo GS nunca haviam sido treinados para qualquer tipo de disciplina eqüestre, enquanto que, os cavalos do grupo GT possuíam grande experiência em provas de enduro de longa distância (80 a 160 km).

Tabela III - Caracterização dos cavalos utilizados nos experimentos.

SEDENTÁRIOS	IDADE (anos)	SEXO	PESO (kg)	TREINO (anos)
GS 1	7	castrado	390	-
GS 2	8	castrado	380	-
GS 3	4	fêmea	390	-
GS 4	6	fêmea	400	-
GS 5	7	fêmea	410	-
GS 6	6	fêmea	420	-
GS 7	7	castrado	450	-
GS 8	10	castrado	440	-
GS 9	10	garanhão	400	-
TREINADOS				
GT 1	11	castrado	390	5
GT 2	11	castrado	430	3
GT 3	10	fêmea	380	5
GT 4	9	castrado	380	4
GT 5	9	castrado	370	4
GT 6	6	castrado	400	1
GT 7	9	fêmea	450	2
GT 8	9	castrado	400	3
GT 9	9	castrado	460	3

É importante ressaltar que a obtenção do consentimento dos proprietários dos animais pertencentes ao grupo treinado, para a realização das biópsias musculares, foi uma dificuldade suplementar considerável. A utilização de eqüinos pertencentes a terceiros foi conseguida fazendo-se as coletas de biópsias em um período de repouso obrigatório, que normalmente é feito após o término de uma temporada anual de competições.

3.2 - Coleta de Biópsias

Após a padronização e marcação do exato local para a coleta das biópsias, amostras de músculo pesando de 30 a 70 mg, foram removidas do músculo glúteo médio esquerdo de todos os cavalos, a uma profundidade de 5 cm, usando-se uma agulha tipo Bergstron com sucção (Skeletal muscle biopsy needle, Popper UCH, 14G – 4,5 mm OD), como mostrado na Figura 8 (A), e um limitador de penetração acoplado à agulha de biópsia. Esta agulha de maior calibre possibilita remover uma maior quantidade de tecido que contenha um número suficiente de fibras musculares indispensáveis para a realização da análise histoquímica. Uma agulha do tipo Trucut (2,0 mm OD) (Figura 8-B), também foi utilizada para a coleta de pequenas amostras destinadas à preparação de homogenato. Esta agulha é menos traumática e dispensa o emprego de bisturi, além de provocar menos receio nos proprietários dos animais. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, transportadas e armazenadas em nitrogênio líquido a -197°C .

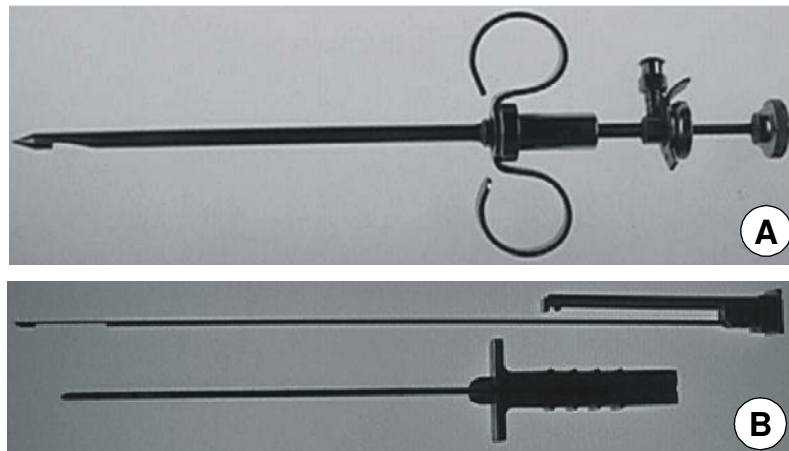


Figura 8 – Agulhas utilizadas para a coleta de biópsias de músculo de cavalo. (A) Agulha tipo Bergstron Skeletal Muscle Biopsy needle, Popper UCH 14G, com sucção, (B) Agulha tipo trucut.

3.2.1 - Técnica de coleta

1 - Determinação do ponto de perfuração para coleta das biópsias usando uma fita métrica milimetrada. Medida da distância entre a tuberosidade ilíaca, em um ponto médio entre as duas extremidades palpáveis da tuberosidade e o vértice formado pela inserção da cauda e a origem aponeurótica do músculo semimembranoso (Figura 9-A). Determinação do ponto de coleta na exata junção entre o primeiro e o segundo terço desta medida (Figura 9-A).

2 - Tricotomia e anestesia local intradérmica com 0,3 ml de lidocaína 2%.

3 - Antissepsia local com iodopolivinilpirrolidona alcoólico.

4 - Pequena incisão cutânea (~0,7 mm) usando-se cabo de bisturi número 3 e lâmina de bisturi número 11.

3 – Materiais e métodos _____

5 - Introdução da agulha UCH até a profundidade de 5 cm, previamente determinada através de um limitador colocado na agulha.

6 - Coleta da amostra (Figura 9-B).

Obs. Quando foi utilizada a agulha trucut, a perfuração da pele com o bisturi e a utilização do limitador de penetração foram dispensados, pois, a agulha trucut possui um bisel cortante suficientemente afiado e marcações externas ao longo de seu corpo.

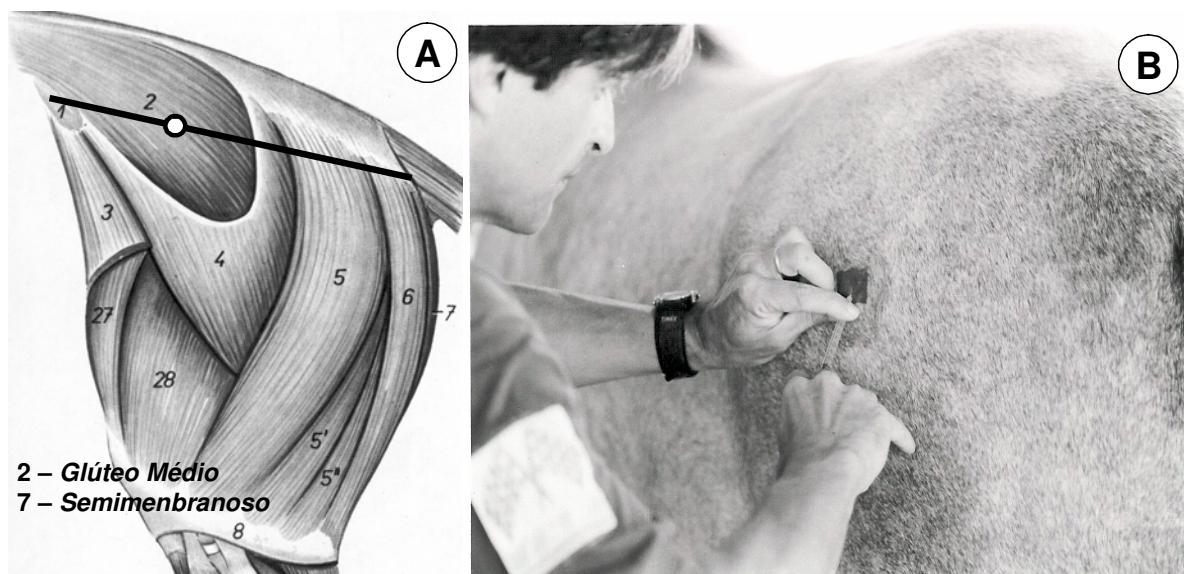


Figura 9 - Determinação do ponto de coleta (A). Tricotomia, anestesia intradérmica e incisão para a penetração da agulha UCH (B).

3.3 - Processamento das Biópsias

3.3.1 - Histoquímica, Imunohistoquímica e Eletroforese

3 – Materiais e métodos

Feixes de fibras musculares (fascículos musculares) foram visualizados com o auxílio de uma lupa sobre gaze embebida em solução fisiológica. Vários fascículos foram orientados verticalmente em “tragacanth gum” sobre suporte de madeira contendo uma identificação da amostra. As amostras montadas foram então mergulhadas em isopentano previamente resfriado em um recipiente de alumínio semi-submerso em nitrogênio líquido. Após o congelamento, todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise.

Para a realização das análises as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e deixadas no criostato por aproximadamente 60 minutos até atingirem a temperatura de -25°C . Cortes transversais seriados na espessura de $9\text{ }\mu\text{m}$ foram efetuados. Os cortes destinados às reações histoquímicas foram depositados em lamínulas de vidro (22 mm^2), enquanto que os destinados à imunohistoquímica foram depositados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxissilano. Os cortes destinados à eletroforese das miosinas foram depositados em tubo Eppendorf contendo tampão de extração.

Os ensaios de histoquímica e eletroforese foram realizados no Departamento de anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob a orientação do Prof. Dr. Gerson Eduardo Ramos Campos. Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Alvarenga.

3.3.2 - Atividade Enzimática

Frações das amostras foram acondicionadas em tubos Eppendorf e diretamente mergulhadas em nitrogênio líquido, onde foram armazenadas para posterior análise.

3.4 - Análise das Isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC)

3.4.1 - Preparo da Amostra

Cortes histológicos congelados (5 a 12 cortes) das amostras de cada cavalo foram colocados em tubo Eppendorf com 0,5 mL de tampão de extração contendo 10% (w/v) de glicerol, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 2,3% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 62,5 mM de tampão TRIS/HCl (pH 6,8). As amostras foram agitadas e aquecidas em banho maria a 60 °C durante 5 minutos. Cinco gotas de glicerol foram então adicionadas a cada tubo e uma vigorosa agitação em agitador (Vortex) foi realizada para uma completa homogeneização da amostra. As amostras foram então re-congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas.

3.4.2 - Protocolo de Separação (SDS-PAGE)

3 – Mat eriais e métodos_____

A eletroforese foi realizada usando-se gel denaturante em gradiente de 7 a 10% no gel de separação e 4% no gel de empacotamento, e com uma proporção de acrilamida/bis-acrilamida de 30.8. Utilizamos uma corrida de 17 a 19 horas em sistema SE 400 da Hoefer ajustado em 120 V. Este protocolo foi padronizado para separação de miosinas humanas e de rato por Bär & Pette (1988). Após a corrida, os géis foram corados com solução de Comassie Blue (0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v) durante 3 horas.

3.4.3 - *Análise Computacional de Imagens*

Para a aquisição de imagem foi utilizado o Sharp Scanner JX-330 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), um “scanner” especializado para géis e membranas de transferência, acoplados a um computador “Pentium”, onde o software Image Master 1D Elite está instalado. Este sistema de análise de imagem combina as etapas de aquisição e processamento digital de imagem dos dados obtidos de géis de SDS-PAGE e membranas de transferência. Dentre outros recursos, estes aplicativos quantificam proteínas, traçam perfis de variação de quantidade de proteínas entre géis, comparam perfis totais de diferentes géis e determinam o peso molecular.

3.5 – *Tipagem de Fibras Musculares*

3.5.1 - *Preparo da Amostra*

Vários cortes histológicos com 9 µm de espessura foram montados em lamínula de vidro para determinação da tipologia muscular através da técnica histoquímica, miofibrilar actino-miosina adenosina trifosfatase (mATPase).

3.5.2 - *Reação Histoquímica para a mATPase*

As amostras de músculo montadas em lamínulas foram incubadas inicialmente em três diferentes meios, dois em pH ácido (Broke & Kaiser, 1970) e um em pH alcalino (Guth & Samaha, 1970). Para a determinação do pH ideal das soluções de incubação para a tipagem de fibras musculares eqüinas, realizamos uma bateria de reações tendo como parâmetro inicial os valores de pH descritos por Rivero e colaboradores (1997). As melhores colorações foram obtidas usando-se nas incubações em meios ácidos pH 4,35 e 4,55, e em meio alcalino pH 10,35. Um ajuste no pH de incubação, através da adição de soluções de NaOH ou HCl, do protocolo para a mATPase é sempre necessário para que haja um ajuste nas tonalidades da reação.

3.5.3 - *Reação Histoquímica Catalítica da Atividade de NADH Diaphorase*

A capacidade oxidativa dos diferentes tipos de fibras musculares foi analisada através de coloração específica da reação de nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR) desenvolvida nas secções transversais seriadas de músculo, segundo Dubowitz & Brooke (1973). Cortes congelados de

3 – Mat eriais e métodos_____

amostras de músculo foram incubados a 37°C por 30 min em tampão Tris 0,2 M, pH 7,4, contendo 0,8 mg/mL de NADH, e 1,0 mg/mL de azul de tetrazólio (NBT). Os cortes foram então fixados por 5 min em formaldeído tamponado 5% (v/v) a 4°C, em pH 7,0. Os cortes fixados foram fortemente enxaguados com água e montados em resina Enttalan ® (1.07961.0100 - Merck, Alemanha) sobre lamínula de vidro (22mm²).

3.6 - Determinação da Área de Secção Transversal das Fibras - Morfometria

Análise morfométrica foi realizada usando-se uma câmera de alto desempenho Express-series CCD conectada a um microscópico óptico Nikon E400 Eclipse. Um campo visual contendo 50 fibras das amostras de cada cavalo foi selecionado para a determinação da secção transversal. As imagens foram digitalizadas e a área de secção transversal foi calculada usando-se o software Image-pro Express 4.0.

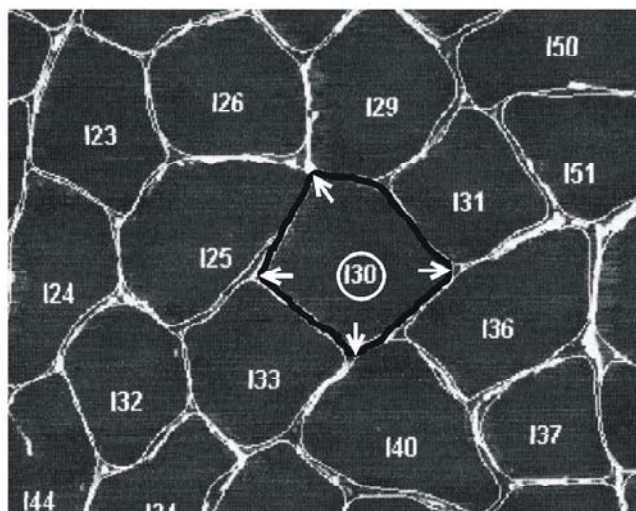


Figura 10 - Determinação da área de secção transversal através do software Image-pro Express 4.0 acoplado a câmera digital Express-series CCD e microscópio óptico Nikon E400 Eclipse. As fibras foram identificadas e seus perímetros foram traçados com o auxílio de um “mouse”.

3.7 - Imunolocalização da nNOS – Imunohistoquímica

3.7.1 - Padronização da Imunohistoquímica em Cérebro e Cerebelo de Rato

Cortes congelados de encéfalo de rato (12 μ m) foram utilizados em ensaio imunohistoquímico pela técnica de imunoperoxidase, visando uma padronização adequada da diluição do anticorpo primário a ser utilizado. Nestes ensaios foram utilizados dois diferentes anticorpos anti-nNOS reativos contra cérebro de rato, camundongo e humano, produzidos em coelho: o anticorpo produzido pelo laboratório Transduction (610310) e o anticorpo produzido pelo laboratório Santa Cruz (sc-648). Um painel de diluições foi elaborado para cada anticorpo, que foi testado em cortes de cérebro, cerebelo, ponte, bulbo e medula, nas

diluições de 1:500, 1:250, 1:125, 1:50, 1:25 e 1:10.

Os cortes histológicos foram enxaguados (3 vezes, 5 min.) com tampão fosfato (“phosphate-buffered saline” – PBS), em pH 7,4, e as peroxidases endógenas foram bloqueadas usando-se tampão PBS contendo 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio repetindo-se por três vezes lavagens de três minutos. Subseqüentemente, o anticorpo primário policlonal anti-nNOS de cérebro de coelho (nNOS) (BD Transduction Laboratórios, Lexington, KY) foi diluído a 1:10 em tampão PBS (pH 7,4) contendo 1% (w/v) de albumina de soro bovina (BSA) e então os cortes foram incubados por uma noite em câmara úmida a 37°C. Concomitantemente foi realizado um experimento controle da reação imunohistoquímica onde o anticorpo primário foi substituído por tampão PBS sem o anticorpo. Depois de intenso enxágüe (3 vezes, 5 min.) em água destilada, os sítios onde ocorreu a reação de antígeno-anticorpo foram revelados através da incubação dos cortes com o polímero de dextran EnVision™ (K1491, DAKO) que contém anticorpos anti IgG de rato e coelho, durante 1 h, a 37°C. A ligação do anticorpo secundário (EnVision™) ao primário foi revelada pela peroxidação da diaminobenzidina (DAB) catalisada pela peroxidase contida no EnVision™. A solução de DAB continha 1% (v/v) de DMSO, 0,5% (v/v) de peróxido de hidrogênio e 0,6% (w/v) de DAB (Farr & Nakane 1981). A técnica da hematoxilina de Meyer foi usada como coloração de fundo. Após a coloração, os cortes foram desidratados em álcool absoluto, enxaguados em xilol e montados com resina Enttalan ® para microscopia.

3.7.2 - Imunolocalização da nNOS em Músculo Esquelético Equino

Cortes transversais seriados obtidos de amostras do músculo glúteo médio esquerdo usando-se um micrótomo de congelamento foram depositados sobre lâmina de vidro previamente tratada com 3-aminopropil-trietoxissilano e armazenadas em biofreezer a -80°C. Os ensaios imunológicos foram processados pela técnica imunohistoquímica de imunoperoxidase.

Visando uma padronização da diluição mais adequada do anticorpo primário a ser utilizado em cortes de músculo, foi elaborado um outro painel de diluições semelhante ao descrito para cortes de encéfalo. Nestes ensaios foram utilizados os anticorpos policlonais anti-nNOS produzidos pelo laboratório Transduction, pois, estes anticorpos demonstraram maior reatividade (veja Figura 16 em 4.5.1, página 61). Os experimentos seguiram o protocolo descrito em 3.7.1, página 50.

3.8 - Quantificação da Atividade Enzimática da NOS

As amostras congeladas de músculo esquelético equino foram cortadas em micrótomo de congelamento e foram analisadas para atividade de síntese de óxido nítrico, que foi determinada pelo método da citrulina descrito por Rees *et al.* (1995) e modificado por Modolo *et al.* (2002).

Amostras de músculo, com aproximadamente 10 a 20 mg, de cavalos sedentários e treinados, foram cortadas em criostato e homogeneizadas na presença e ausência de Triton-X100 a 1% (v/v) em 500 µL de tampão de extração Tris-HCl (50 mM) em pH 7,4 resfriado, contendo 320 mM de sacarose, 10 µg de leupeptina/mL,

3 – Materiais e métodos

10 µg de inibidor de tripsina de feijão-soja/mL, 2 µg de aprotinina/mL, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 10 mM de ditioneitol e 10 mM de glutatona. O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante das amostras, com ou sem 1% de Triton-X100, foram usados no ensaio de citrulina. Quarenta microlitros de cada sobrenadante foram adicionado a 100 µL de Tampão de ensaio HEPES (40 mM) pH 7,2, contendo 1 mM de MgCl₂, 0,2 mM de CaCl₂, 20 µM de L-citrulina, 22,5 µM de L-arginina, 50 mM L-valina, 10 µM de FAD, 10 µM de FMN, 1 mM de ditioneitol, 50 µM de 6(R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, 3,5 µg de calmodulina/mL, 0,1 mM β-NADPH e 0,5 µCi de L-[U-¹⁴C]arginina/mL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Após incubação de 30 min a temperatura ambiente, a reação foi paralisada adicionando-se 1 mL de Dowex[®]-Ag 50W (malha de 200-400, carregada com 8% de Na⁺) suspenso em tampão HEPES (100 mM) contendo 10 mM de EDTA, em pH 5,5 (1:1,5, v/v). A resina foi posteriormente removida através de centrifugação a 10.000 g durante 10 min a 18 °C e 400 µL do sobrenadante resultante foi adicionado a 3 mL de líquido de cintilação. A emissão de partículas radioativas foi contada em um cintilador Beckman LS 6000. A atividade de NO sintase foi determinada como sendo a diferença entre o total de L-[U-¹⁴C] citrulina produzida em meio de reação completo e a L-[U-¹⁴C] citrulina produzida em meio de reação contendo 3 mM de L-NAME. A dependência de Ca²⁺ foi verificada usando-se um meio de reação contendo 2 mM de EGTA.

3.8.1 - Dosagem de Proteína

3 – Mat eriais e métodos_____

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de “Coomassie blue” (Bradford, 1976) usando-se reagente para proteínas Bio-Rad e BSA a 0,1% como padrão.

3.9 - *Análise Estatística*

Todos os dados foram analisados usando-se o Student's t-teste e ANOVA seguido de teste de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis também foi usado porque para um pequeno número de amostras, análises preliminares indicaram que um teste não paramétrico e o uso da mediana, ao invés da média dos dados, seria mais apropriado para comparações entre os dois grupos de cavalos.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 - Cadeia Pesada da Miosina (*MyHC*)

As análises das cadeias pesadas da miosina (*MyHC*) das biópsias do músculo glúteo médio esquerdo dos nove cavalos sedentários e dos nove cavalos treinados para enduro identificaram as três isoformas de *MyHC*, cujas expressões em músculo esquelético eqüino já foram anteriormente descritas por outros autores (Rivero *et al.*, 1996a). Estas isoformas de *MyHC* foram claramente separadas pela suas mobilidades específicas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A *MyHC I* foi a banda de mais rápida migração (banda inferior), *MyHC IIx* apresentou uma migração intermediária (banda intermediária) e *MyHC IIa* foi a banda que apresentou a mais lenta migração (banda superior), como ficou mostrado pela coloração de “Coomassie Blue” dos géis de eletroforese (Figura 11).

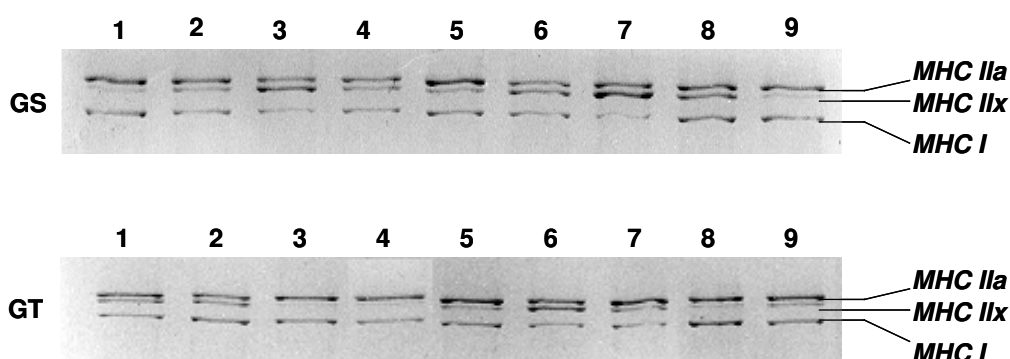


Figura 11 - Gel de eletroforese de biópsias do músculo glúteo médio esquerdo, removidas à profundidade de 5,0 cm., de nove cavalos sedentários (GS) e nove cavalos treinados para enduro (GT). As isoformas da cadeia pesada da miosina (*MyHC*) foram identificadas como *MyHC I*, *MyHC IIa* e *MyHC IIx*.

O conteúdo de *MyHCs* da amostra de cada cavalo foi quantificado através de densitometria e os valores das percentagens relativas de cada *MyHC* dos dois grupos de cavalos foram calculadas. Apesar da variabilidade individual observada no conteúdo de *MyHC*, foi possível verificar uma diferenciada distribuição dos tipos de fibras musculares entre o grupo GS e o grupo GT (Figura 12). No grupo de cavalos treinados (GT) foi observada uma percentagem relativa significativamente mais alta ($P = 0,047$) da isoforma *MyHC IIa* (56.5% contra 46.0% no grupo GS) e, conseqüentemente, uma também significativa ($P = 0,031$) menor percentagem relativa da isoforma *MyHC IIx* (15,0% contra 29,4% no grupo GS). Os cavalos treinados também apresentaram uma maior percentagem relativa da isoforma *MyHC I* (28,7% contra 24,4% no grupo GS). Contudo, esta diferença não foi significativa ($P > 0,05$).

A Figura 11 também mostra que os indivíduos do grupo sedentário (GS) apresentaram variações significativas na expressão das miosinas, evidenciando uma variabilidade fenotípica, muito provavelmente devida a uma diversidade genotípica. Alguns indivíduos do GS apresentaram um perfil de isoformas de miosinas semelhante ao perfil apresentado por cavalos pertencentes ao grupo treinado (GT), que se caracterizou por uma baixa concentração da isoforma *MyHC IIx*, e uma maior percentagem relativa das isoformas *MyHC I* e *IIa* (Figuras 11 e 12). Também pode ser visto no GT, indivíduos com um perfil de miosinas semelhante à média dos membros do GS, onde ocorre uma mais alta percentagem relativa da isoforma *MyHC IIx*, e conseqüentemente uma menor percentagem relativa das

isoformas *MyHC I* e *Ila* (Figuras 11 e 12). Os resultados individuais de todos os cavalos estão descritos nos apêndices I e II (páginas 111 e 112).

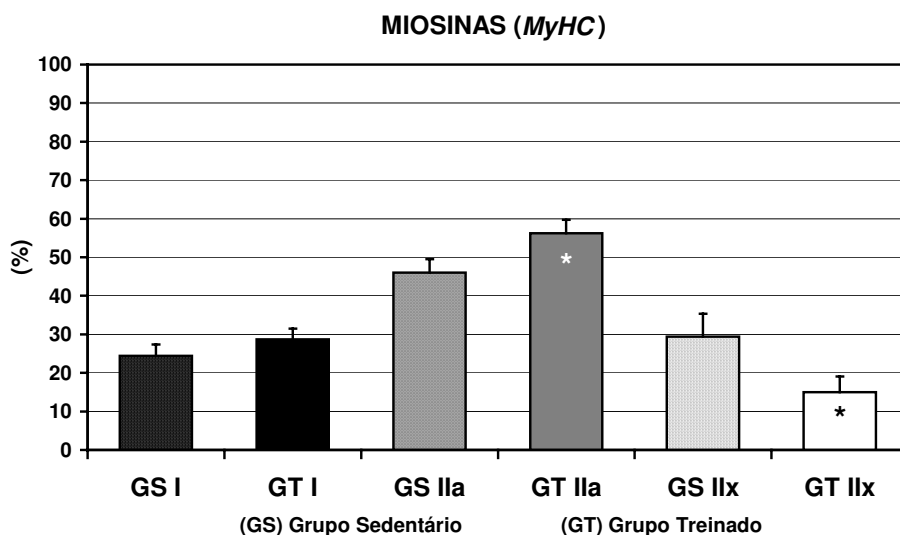


Figura 12 - Concentrações relativas das isoformas de miosinas *MyHC I*, *MyHC Ila* e *MyHC Ilx* em músculo glúteo médio esquerdo de cavalos sedentários (GS) e treinados (GT) para enduro. (*) Significativamente diferente de GS.

4.2 - Tipagem Muscular

Para a classificação dos diferentes tipos de fibras musculares constituintes do músculo glúteo médio de cada cavalo pertencente aos grupos GS e GT, foi utilizada a reação histoquímica baseada na atividade de ATPase da cabeça da miosina.

A Figura 13 mostra um painel descritivo das diferentes intensidades da reação histoquímica para a mATPase em cortes transversais de amostra de músculo obtida de um cavalo pertencente ao grupo sedentário (GS), e pré-incubadas em

diferentes pHs. Em (A), a pré-incubação no pH de 4,55 mostra quatro diferentes tipos de fibras musculares. As fibras do tipo I, IIA, IIX e IIAX. Em (B), no pH ácido de 4,35 as fibras do tipo II são inibidas e apenas as fibras do tipo I são coradas. Em (C), no pH 10,35, as fibras do tipo I são inibidas, corando-se apenas as fibras do tipo II. Os sub-tipos das fibras do tipo II puderam ser distinguidos pelas diferenças na atividade de hidrólise de ATP demonstradas no pH 4,55, onde as fibras “puras” do tipo IIX apresentam uma alta atividade enquanto as fibras “puras” do tipo IIA apresentam baixa atividade, quando comparadas às fibras do tipo I. Também, neste mesmo pH (4,55), uma fibra considerada “híbrida” pode ser identificada devido a sua intensidade de atividade de mATPase, que é intermediária entre a tipo IIA e a do tipo IIX.

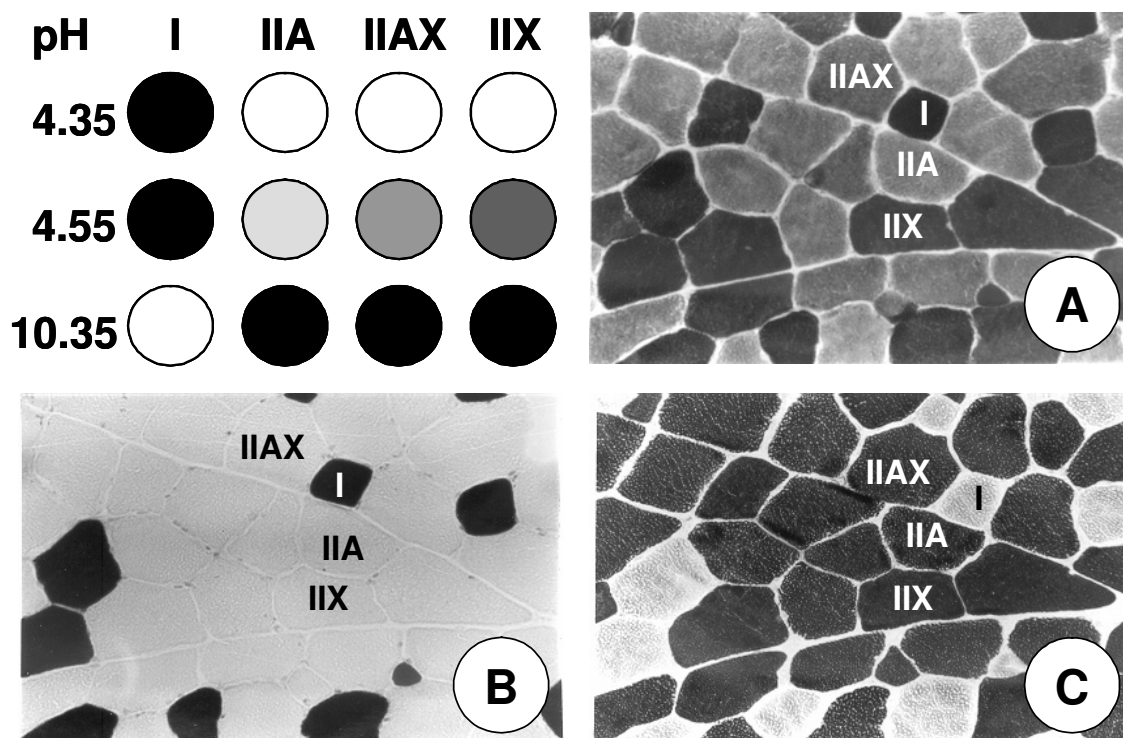


Figura 13 - Reação histoquímica para a mATPase em corte transversal de músculo glúteo médio esquerdo de um cavalo sedentário. A tabela no canto superior esquerdo da figura mostra a intensidade da atividade ATPásica das miosinas em pH 4,55 e 4,35 (A e B) e 10,35 (C). No pH intermediário de 4,55 (A) diferentes intensidades da reação da mATPase identificam quatro tipos de fibras: I, fibra tipo I; IIA, fibra tipo IIA; IIX, fibra tipo IIX; IIAX, fibra híbrida do tipo IIAX. Ampliação original, 200 X.

Portanto, a análise histoquímica para a mATPase permitiu a identificação de três grupos de tipos “puros” de fibras musculares, que incluem as fibras lentas oxidativas (tipo I), as fibras rápidas oxidativas e glicolíticas (tipo IIA) e as fibras rápidas glicolíticas (tipo IIX) e também uma fibra “híbrida” oxidativa e glicolítica (tipo IIAX). Fibras musculares “híbridas” do tipo C não foram identificadas pela técnica de mATPase, provavelmente porque estas fibras normalmente representam,

em músculo esquelético eqüino, uma população pouco considerável (1-2%) (Rivero *et al.*, 1993). Este tipo de fibra muscular somente foi identificado em músculo eqüino através de técnica imunohistoquímica (Rivero *et al.*, 1996a).

A distribuição dos diferentes tipos de fibras, que foram tipadas conforme seu conteúdo predominante de miosinas em cada grupo de cavalos, foi quantificada e os conteúdos relativos médios destas fibras estão mostrados na Figura 14. O músculo glúteo médio de cavalos sedentários mostrou, na profundidade de 5,0 cm, ser composto predominantemente de fibras “puras” rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIA (39,3%), e fibras rápidas glicolíticas do tipo IIX (31,4%), possuindo ainda uma população significativa de fibras lentas oxidativas do tipo I (25,1%). As fibras híbridas do tipo IIAX corresponderam a 4,1% da população total.

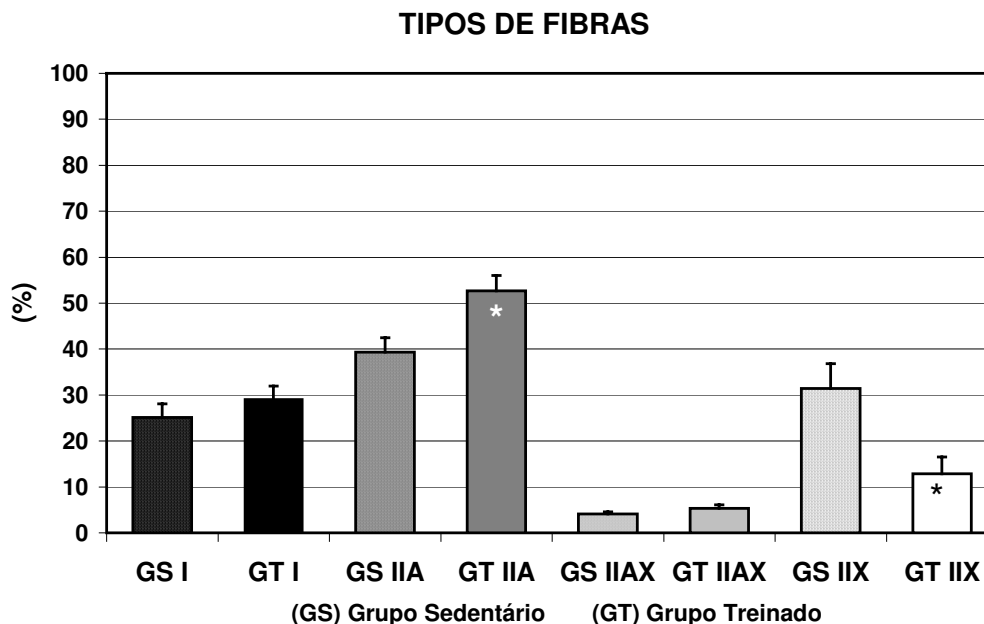


Figura 14 - Distribuição relativa dos quatro diferentes tipos de fibras musculares identificados no músculo glúteo médio esquerdo de cavalos sedentários (GS) e treinados (GT). (*) Significativamente diferente de GS.

O músculo esquelético de cavalos pertencentes ao grupo treinado (GT) apresentou uma maior porcentagem relativa média de fibras “puras” lentas oxidativas do tipo I (29,1%), de fibras “puras” rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIA (52,6%) e de fibras “híbridas” do tipo IIAX (5,3%) quando comparada com as médias do grupo GS (tipo I 25,1%, tipo IIA 39,3% e tipo IIAX 4,1%, respectivamente). Entretanto, a análise estatística destas médias demonstrou diferença significativa ($P>0,05$) apenas para as fibras do tipo IIA. A porcentagem relativa média das fibras puras rápidas glicolíticas do tipo IIX foi significativamente menor ($P<0,01$) no grupo GT (12,8%), quando comparado com o grupo GS (31,4%). A Figura 14 também mostra que as diferenças entre os grupos GS e GT, observadas na composição dos tipos de fibras musculares do músculo glúteo médio esquerdo, estão correlacionadas com as diferenças encontradas no conteúdo relativo de *MyHC* (Figura 11). Os resultados individuais de todos os cavalos estão descritos nos apêndices I e II (páginas 111 e 112).

4.3 – Histoquímica para NADH Desidrogenase

Usando-se cortes transversais seriados de fascículos musculares, combinamos a tipagem muscular, baseada nas miosinas, com a reação histoquímica para a NADH desidrogenase. Desta forma, caracterizamos o perfil metabólico de cada tipo de fibra. Como pode ser visto na Figura 15 (B e D), as fibras do tipo I mostraram uma alta atividade de NADH diaforase, enquanto as fibras do tipo IIX apresentaram uma baixa atividade para esta mesma reação, caracterizada por uma

fraca intensidade de coloração pelo azul de tetrazólio. As fibras do tipo IIA e as fibras do tipo IIAX mostram um nível intermediário de atividade de NADH diaforase. Este resultado mostra que uma decrescente capacidade oxidativa ($I > IIA > IIAX > IIX$) está relacionada diretamente com a tipagem muscular pela atividade de mATPase (Figura 15, A e C).

Além disso, a marcação pela NADH diaforase foi mais forte em todos os tipos de fibras musculares dos cavalos pertencentes ao grupo GT (Figura 15, D). Esta diferença pode ser melhor visualizada comparando-se a coloração das fibras do tipo IIX de cavalo treinado com as mesmas fibras de cavalo sedentário. Este resultado sugere um maior número de mitocôndrias nas fibras musculares de cavalos treinados e estaria de acordo com prévias observações de que o treinamento de resistência induz uma adaptação oxidativa no músculo (Pette & Staron, 2001).

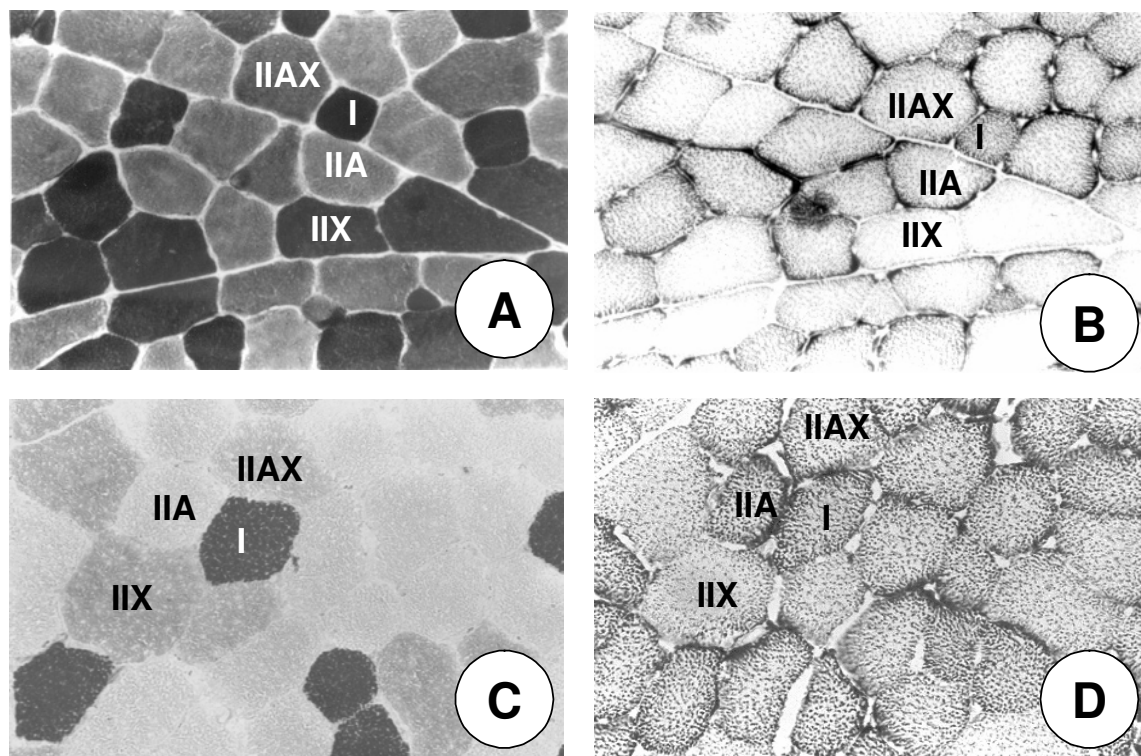


Figura 15 - Comparação entre a reação histoquímica para a mATPase (A e C) e para a NADH diaphorase (B e D) em secção transversal de amostras de músculo glúteo médio esquerdo de cavalo sedentário (A e B), e de cavalo treinado (C e D), mostrando uma mais forte marcação na amostra do cavalo treinado. As mesmas fibras estão assinaladas em ambas as reações. No cavalo sedentário as fibras musculares apresentam uma crescente marcação (capacidade oxidativa) no seguinte sentido: I > IIA > IIAX > IIX. No cavalo treinado as fibras musculares apresentam a seguinte ordem de intensidade de marcação: I = IIA > IIAX > IIX.

4.4 - Área de Secção Transversal

A Tabela II mostra as médias $\pm$ EPM (em μm^2) das áreas de secção transversal dos tipos de fibras dos cavalos sedentários e treinados.

Tabela III – Área de secção transversal (μm^2) dos quatro diferentes tipos de fibras musculares identificados no músculo glúteo médio de cavalos sedentários (GS) e treinados (GT). Os valores estão em médias $\pm$ EPM de um total de 50 fibras de cada um dos nove cavalos de cada grupo. Não foi encontrada diferença significativa entre GS e GT, para qualquer um dos tipos de fibra, usando-se tanto testes estatísticos paramétricos como não-paramétricos.

Tipos de fibras	GS	GT
I	1813 $\pm$ 84	1912 $\pm$ 63
IIA	2130 $\pm$ 66	2221 $\pm$ 79
IIAX	2305 $\pm$ 118	2305 $\pm$ 164
IIX	2433 $\pm$ 61	2367 $\pm$ 100

As fibras do tipo I e IIA de cavalos treinados apresentaram uma maior área de secção transversal, embora esta diferença, comparada aos resultados do grupo GS não tenha sido significativa ($P>0,05$). Não foi encontrada nenhuma diferença, entre os dois grupos de cavalos, nos tamanhos das fibras “híbridas” do tipo IIAX, enquanto que a área de secção transversal das fibras do tipo IIX foi menor nas amostras dos cavalos treinados ($P>0,05$). Embora as diferenças relativas às áreas de secção transversal dos diferentes tipos de fibras encontradas entre os dois grupos de cavalos não tenham sido significativas, os resultados indicam uma tendência de hipertrofia das fibras lentas (tipo I) e rápidas (tipo IIA) e uma atrofia das fibras rápidas do tipo IIX. Além disso, os resultados da morfometria mostram que as diferenças observadas nos tamanhos das fibras musculares dos dois grupos de cavalos também estão diretamente correlacionadas com as diferenças observadas na expressão das *MyHCs* e na tipagem muscular baseada na atividade de mATPase.

4.5 - *Imunolocalização da nNOS*

4.5.1 - *Imunolocalização da nNOS em Cérebro e Cerebelo de Rato*

Os ensaios realizados em cérebro e cerebelo de rato, onde testamos a reatividade dos anticorpos anti-nNOS produzidos pelos laboratórios Santa e Cruz e Transduction, revelaram uma forte marcação em corpos celulares de neurônios piramidais da segunda camada do córtex cerebral (Figura 16, B), e uma moderada marcação nas células de Purking no cerebelo (Figura 16, D e E). A Figura 16 (A) e (C) mostram reações negativas para a nNOS, nos mesmos campos visuais mostrados em (B), (D) e (E), onde o anticorpo primário foi substituído por tampão PBS. O anticorpo nNOS produzido pelo laboratório Transduction, mesmo em diluições maiores, apresentou uma marcação mais forte em todos os cortes histológicos testados (Figura 16, D). Por este motivo, este anticorpo foi escolhido para ser utilizado nos experimentos com amostras musculares. A expressão da nNOS também foi demonstrada no plexo coriódio do cérebro de rato (resultado não mostrado).

4 – Resultados

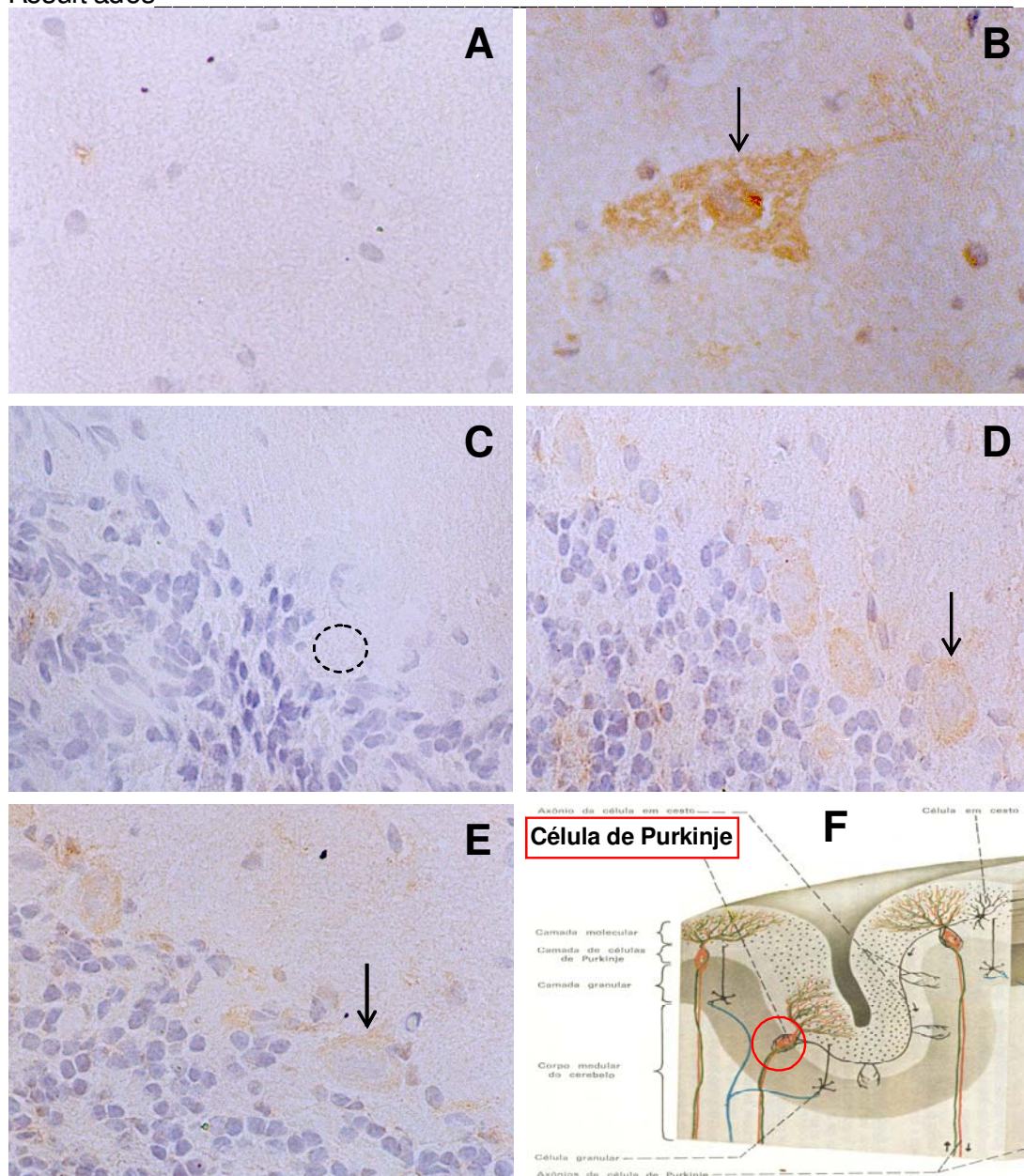


Figura 16 – Imunohistoquímica da nNOS em cérebro e cerebelo de rato. Cérebro de rato: (A) Controle negativo e (B) imonolocalização da nNOS em corpos celulares de neurônios piramidais, usando-se anticorpo Transduction - 1:50. Cerebelo de rato: (C) controle negativo; (D) Imunomarcacão para a nNOS em células de Purking, usando-se anticorpo Transduction 1:50 e (E) imunomarcacão para a nNOS em células de Purkinje usando-se anticorpo Santa Cruz - 1:10. (F) Diagrama esquemático de duas folhas do cerebelo mostrando o arranjo das células e das fibras no córtex cerebelar (Machado, 1981). Ampliação original 400X (C, D e E) e 1000X (A e B).

4.5.2 - Imunolocalização da nNOS em Músculo Esquelético Equino

A análise imunohistoquímica das amostras musculares, coletadas através de biópsias de cavalos sedentários e treinados, revelaram uma reação positiva em todas as amostras testadas contra o anticorpo policlonal anti-nNOS (Transduction Lab.). A imunolocalização da nNOS apresentou uma forte marcação nas amostras de músculo dos animais do grupo GT (Figura 17, A), quando comparado com os resultados do grupo GS (Figura 17, B). A marcação da nNOS nas amostras de cavalos sedentários mostrou-se fraca e praticamente restrita às áreas subsarcolemais, sugerindo ser uma proteína ancorada à membrana, como o “splicing” alternativo da nNOS, a nNOS μ . Diferentemente, a imunolocalização da nNOS em músculo de cavalos treinados apresentou uma forte marcação, especialmente nas áreas subsarcolemais, mas também em toda a superfície da fibra, sugerindo que outros “splicings” alternativos da nNOS, além da nNOS μ , podem estar sendo expressos nestes indivíduos sob condições de exercício, como a nNOS α , a nNOS β e/ou a nNOS γ . Nenhuma reação positiva foi visualizada nas amostras usadas como controle negativo (Figura 17, C), onde o anticorpo primário anti-nNOS foi substituído por tampão. Nestas amostras a marcação dos núcleos celulares pela hematoxilina de Meyer pode ser claramente observada. A Figura 17 (D) mostra o mesmo campo visual da Figura 17 (C), mas neste caso o corte histológico foi incubado com o anticorpo primário anti-nNOS. A Figura 17 também mostra que a marcação para a nNOS apresenta uma distribuição heterogênea na superfície do tecido muscular, indicando a ocorrência de uma expressão diferenciada entre os

diferentes tipos de fibras musculares.

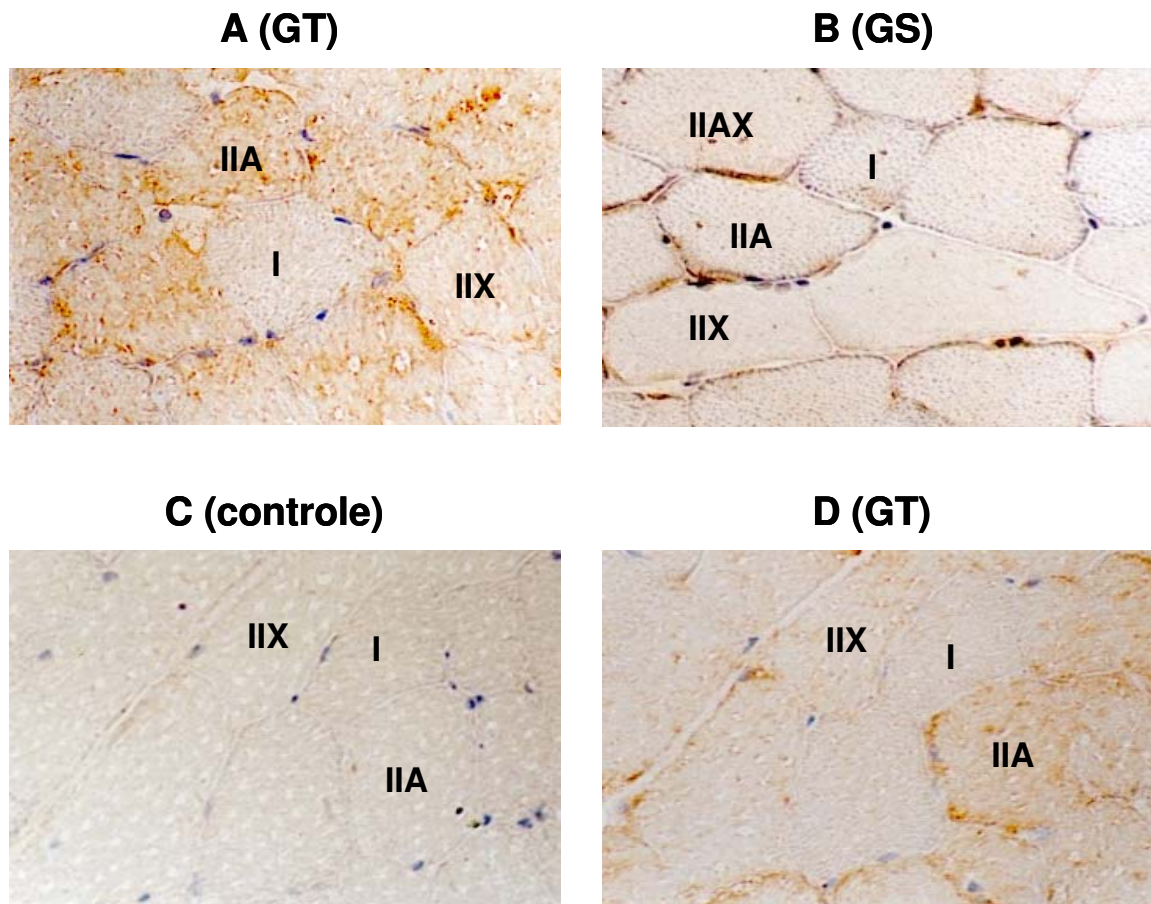


Figura 17 - Imunocoloração para a nNOS em músculo glúteo médio de cavalos sedentários e treinados. Reação positiva para a nNOS em cavalo treinado (A) e sedentário (B). (C) e (D) são cortes transversais seriados subseqüentes de músculo de um cavalo treinado. Em (C) o anticorpo primário anti-nNOS foi substituído por tampão PBS (controle negativo). Em (D) a marcação positiva em reação imunohistoquímica completa para a nNOS. Os tipos de fibras musculares foram determinados pela reação histoquímica para a mATPase e comparada à histoquímica para a NADH-diaforase. O painel (B) é uma ampliação de uma secção transversal seriada subseqüente aos cortes histológicos usados na tipagem muscular mostrados na Figura 13 (A-C) e na Figura 15 (A) e (B). Ampliação original, 400 X.

Realmente, comparando-se a reação imunohistoquímica para nNOS com as reações histoquímicas para a mATPase e a NADH diaphorase, cujos cortes histológicos seriados foram processados seqüencialmente, podemos correlacionar a expressão da nNOS com a tipagem das fibras musculares. A Figura 15 (A) e (B) mostra a histoquímica para a mATPase (15-A) e para a NADH-TR (15-B) em uma área de tecido muscular de um cavalo sedentário, enquanto a Figura 17-B mostra o mesmo campo visual de um corte subsequente marcado pela reação imunohistoquímica da nNOS. Como pode ser visto, a marcação da nNOS aconteceu principalmente nas áreas subsarcolemais das fibras “puras” rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIA e das fibras “híbridas” rápidas oxidativas e glicolíticas do tipo IIX. As fibras rápidas glicolíticas do tipo IIX e lentas oxidativas do tipo I não estão marcadas. Como resultado desta não marcação pela nNOS, uma marcação de organelas basófilas pela hematoxilina (azul) pode ser visualizada como uma coloração diferencial de fundo nestes dois tipos de fibras. Uma forte coloração azul nas fibras do tipo I contrasta com uma fraca coloração nas fibras do tipo IIX. A Figura 17 (A) também mostra que a marcação mais forte para a nNOS, observada tanto na periferia como no citoplasma de amostras de cavalos treinados, corresponde à fibra “pura” rápida oxidativa e glicolítica do tipo IIA. Além da fibra IIA, as fibras do tipo IIX de cavalos do grupo treinado também apresentaram reação positiva para nNOS em contraste com os cavalos sedentários. As fibras lentas oxidativas do tipo I não demonstraram expressar a nNOS em nenhuma das duas condições analisadas, sedentarismo e treinamento. A análise conjunta de todos os resultados mostra que o nível de expressão e a localização subcelular da nNOS no músculo glúteo médio

eqüino são influenciadas pela tipologia muscular e alterada pelo treinamento de resistência.

4.6 - *mATPase e Localização da NOS em “Ring Fibers”*

As fibras musculares em forma de anel (“ring fibers”) são pouco estudadas do ponto de vista bioquímico, e sua significância é controversa. Entretanto, sua ocorrência está bem descrita, associada a inúmeros processos degenerativos musculares, tais como: miopatias crônicas, atrofia muscular de origem espinal e artrite reumatóide. Nestas fibras ocorre uma orientação anormal das miofibrilas. Sua ocorrência foi descrita pela primeira vez em 1893 (Dubowitz & Brooke, 1973).

Pode-se notar claramente na Figura 18 (B) e (D), que a fibra identificada com um asterisco é uma fibra do tipo I e está incrustada dentro de uma fibra do tipo II. Esta fibra foi encontrada em biópsia de um eqüino sadio pertencente ao grupo sedentário (GS 5). Um interessante achado mostrado nesta amostra de músculo, foi uma forte marcação para a nNOS nesta “ring fiber” (Figura 19).

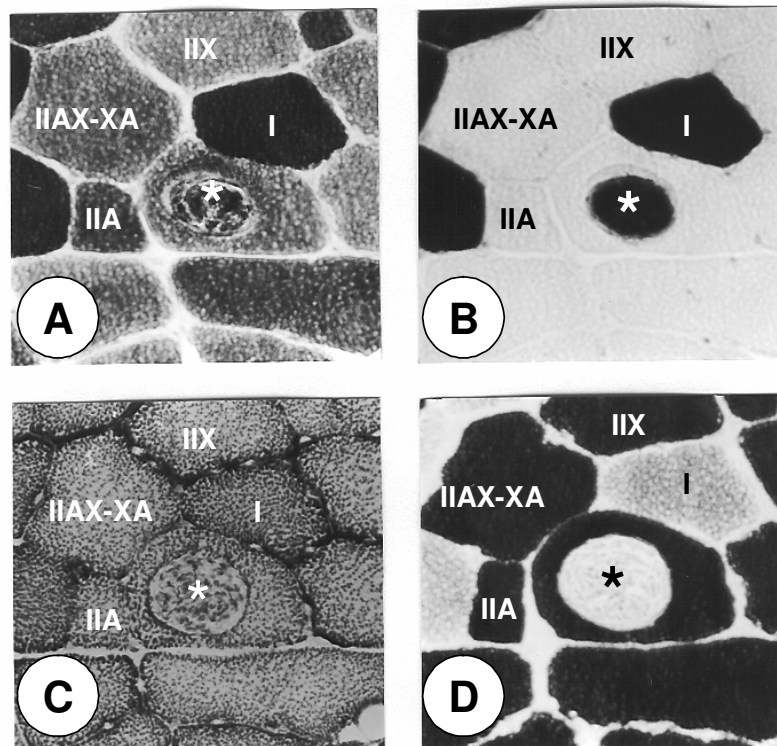


Figura 18 - Reação histoquímica para a mATPase no pH 4,55 (A) e 4,35 (B), e no pH 10,35 (D), e a reação para a NADH desidrogenase (C). A análise dos diferentes pHs mostra a diferenciação entre as fibras dos tipos I e II, e a provável expressão da *MyHC I* dentro de uma “ring fiber” contida em uma fibra do tipo II.

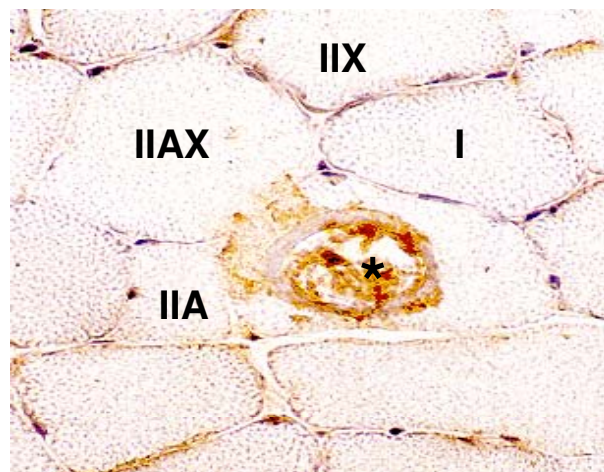


Figura 19 – Imunohistoquímica positiva para a nNOS na “ring fiber”. Idêntico campo visual mostrado na figura 18.

4.7 - Atividade de Óxido Nítrico Sintase

Conforme pode ser observado na Figura 20 (A), A atividade de óxido nítrico sintase, determinada na fração solúvel dos homogenatos de músculo eqüino, não apresentou diferença significativa entre os grupos GS ($44,5 \pm 2,1$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$, n=9) e GT ($42,8 \pm 1,2$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$, n=9). A determinação da conversão de L-arginina para L-citrulina na presença de EGTA permitiu verificar que a atividade NOS na fração solúvel é predominantemente do tipo Ca^{2+} -dependente ($36,1 \pm 3,7$ e $35,7 \pm 3,8$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para amostras do GS e GT, respectivamente), (Figura 20, A). Diferente resultado da atividade da NOS foi encontrado a nas frações particuladas, obtidas pela extração com Triton X-100 1% (Figura 20, B). Nestes ensaios a atividade da NOS foi maior nos animais treinados (GT). Uma atividade da NOS em torno de 300% maior ($163,7 \pm 36,1$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) foi demonstrada em amostras do grupo GT, quando comparada com os valores obtidos para as amostras do grupo de GS ($55,1 \pm 10,0$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$). As atividades da NOS nas frações particuladas das amostras dos grupos GT e GS apresentaram dependência parcial de Ca^{2+} ($70,0 \pm 38,8$ e $36,7 \pm 5,7$ pmol L-[U- ^{14}C]citrulina $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente) (Figura 20, B).

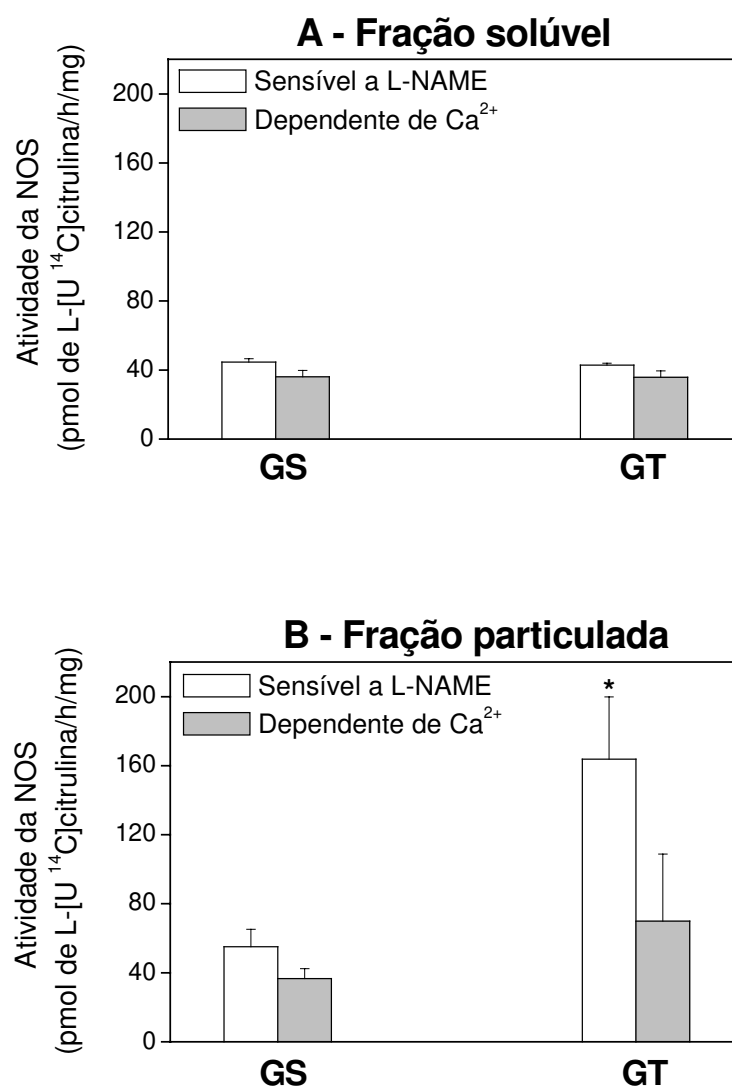


Figura 20 - Atividade de óxido nítrico sintase em amostras de músculo de cavalos sedentários (GS) e treinados (GT). O tecido foi homogeneizado sem (A) e com (B) Triton X-100 1%, em meio contendo todos os co-fatores da NOS e, em seguida, os sobrenadantes foram analisados para atividade NOS. Os resultados foram expressos como a diferença entre a formação total de L-[U-¹⁴C]citrulina em meio de reação completo e aquela produzida em meio contendo 3 mM de L-NAME (sensível a L-NAME) ou 2 mM de EGTA (dependente de Ca²⁺). Cada barra representa a média $\pm$ EPM de dois experimentos processados em triplicata. *P < 0.05 (Student' t test).

DI SCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

5.1 – *Tipagem muscular. Miosinas, mATPase e NADH desidrogenase*

As diferenças observadas no fenótipo muscular de cavalos sedentários e treinados, presumivelmente induzidas pela prática desportiva e evidenciadas tanto pelo perfil da expressão das isoformas de miosina como pela tipologia das fibras musculares, estão em concordância com estudos prévios sobre o efeito do treinamento de resistência realizados em eqüinos (Rivero *et al.*, 1993, 2000). Naqueles trabalhos foi demonstrado que o treinamento de longa distância e duração, realizado em baixa intensidade, resulta em um aumento na porcentagem relativa de fibras lentas oxidativas (tipo I) e de fibras rápidas oxidativas e glicolíticas (tipo IIA), enquanto que, a porcentagem relativa das fibras rápidas glicolíticas (tipo IIX) diminui. Além disto, também ocorre um aumento na porcentagem relativa de fibras híbridas, como as do tipo IIAX, e um concomitante aumento na área de secção transversal das fibras musculares que se correlaciona positivamente com a interconversão miofibrilar. Estas alterações são consideradas adaptações induzidas resultantes de um programa de treinamento de resistência em cavalos (Rivero *et al.*, 1993, 2000).

Os resultados referentes à tipologia muscular, descritos no capítulo anterior, mostram uma caracterização fenotípica bem definida, distinguindo os cavalos sedentários dos treinados. Mesmo tendo sido usado um modelo biológico experimental com dois grupos independentes de cavalos, a caracterização destes dois grupos (GS e GT) permitiu traçar uma correlação entre a tipologia muscular e a expressão da nNOS, e o efeito do treinamento sobre ambos.

Esta diferenciação valida nossa avaliação sobre os efeitos da prática da disciplina de enduro eqüestre, que pode ser definida como sendo um treinamento de resistência onde predomina exercícios de baixa intensidade e longa duração, na expressão da nNOS em músculo esquelético eqüino. Frequentemente, estudos objetivando a avaliação dos efeitos do treinamento sobre o tecido muscular são realizados usando-se amostras dependentes, onde os indivíduos são avaliados antes e após o treinamento.

Apesar de uma boa distinção entre os dois grupos de cavalos, demonstrada na tipologia muscular, foi observada uma variabilidade fenotípica entre indivíduos do mesmo grupo. Esta variabilidade individual determina fenótipos musculares mais ou menos apropriados para o exercício de resistência. Na Figura 21 podemos observar nas imagens dos géis, as bandas de miosinas e na tabela ao lado, a porcentagem relativa para cada isoforma. O cavalo 6GT apresenta um perfil de miosinas semelhante a um perfil de um cavalo sedentário representado pelo cavalo 7GS. Resultado similar e diametralmente oposto está representado pelo cavalo 9GS que apresenta um perfil de miosinas semelhante à de um cavalo treinado representado por 4GT.

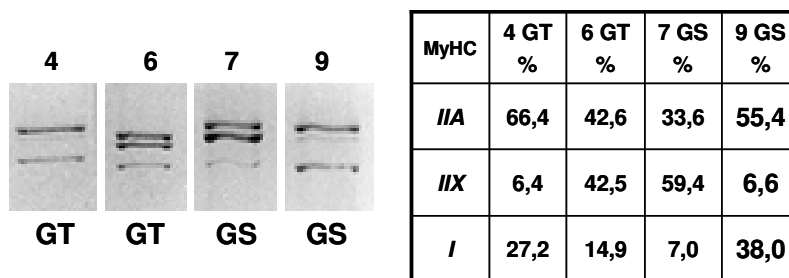


Figura 21 - Separação das miosinas dos cavalos pertencentes ao GS (7 e 9) e dos pertencentes ao GT (4 e 6) mostrando na tabela ao lado as porcentagens relativas de cada isoforma de *MyHC*.

Indivíduos, linhagens ou raças de cavalos com um perfil de miosinas com um conteúdo relativo mais alto de fibras oxidativas dos tipos I e IIA, e conseqüentemente, baixa porcentagem relativa de fibras glicolíticas do tipo IIX, podem ser considerados, do ponto de vista do metabolismo muscular, geneticamente mais adaptados para a prática do enduro eqüestre. A Figura 22 mostra o perfil de miosinas e suas correspondentes porcentagens relativas de três cavalos (3GT, 9GS e 8GT) que são filhos de um mesmo reprodutor em diferentes éguas. Este resultado sugere que a semelhança apresentada em seus resultados possui um determinante hereditário, que aparenta ter mais influencia sobre o fenótipo muscular do que o treinamento. Portanto, a tipagem muscular pode se tornar uma ferramenta diagnóstica importante para se determinar precocemente uma habilidade atlética individual, e monitorar periodicamente as adaptações desejáveis do tecido muscular.

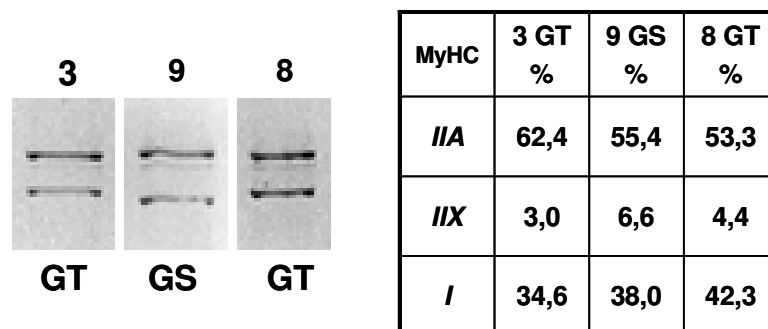


Figura 22 - Separação das miosinas dos cavalos pertencentes ao GT (3 e 8) e um cavalo pertencente ao GS (9) mostrando na tabela ao lado as porcentagens relativas de cada isoforma de *MyHC*. Todos os três cavalos são filhos do mesmo reprodutor.

5.1.1 - *Predição do desempenho atlético pela tipagem muscular*

No cavalo como no atleta humano, a performance esportiva em qualquer disciplina depende de um grande número de fatores favoráveis intrínsecos e extrínsecos. Os atributos neurosensoriais, a capacidade cardio-respiratória, as propriedades contráteis dos músculos e as características locomotoras individuais são os principais fatores intrínsecos implicados no esforço físico. Portanto, o desempenho esportivo é uma aptidão complexa e de muito difícil predição. Deixando-se de lado aspectos ambientais, poderíamos dizer que o desempenho atlético é medianamente correlacionado com a composição muscular. Os criadores de cavalos de corrida já constataram empiricamente, há séculos, a possibilidade de selecionar indiretamente características musculares através da análise de desempenho em corridas.

Estudos sobre o determinismo da tipologia muscular mostraram o envolvimento do sistema nervoso na diferenciação das fibras musculares. Esta interferência reguladora neuronal é evidente em todas as funções orgânicas, e especialmente marcante nas características comportamentais de eqüinos. Sua reatividade durante o esforço físico e seu temperamento, aspectos facilmente percebidos por qualquer cavaleiro, não são características independentes de suas características metabólicas musculares. São características fisiológicas e metabólicas particulares que demonstram o conceito empírico de “cavalo de sangue”. Em corridas de resistência a tipologia muscular favorece, e muito provavelmente é fator determinante, mas não limitante, na avaliação do potencial atlético individual. Semelhante determinismo do fenótipo muscular também envolve as competições rápidas de curtas distâncias, onde uma tipologia adequada é um importante fator de bom desempenho.

5.1.2 - *Perspectivas quanto à utilização da tipologia muscular na seleção eqüina*

Uma aplicação da tipagem muscular na seleção de cavalos para esporte requer, inicialmente, uma demonstração de que certas tipologias musculares são mais favoráveis à prática de determinadas disciplinas eqüestres. Posteriormente, se faz necessário estimar a herdabilidade das características histológicas e bioquímicas dos principais músculos implicados no esforço. Em atletas humanos, a tipologia muscular é sem dúvida um parâmetro diretamente relacionado com o desempenho atlético em disciplinas que apresentam um componente físico e

metabólico dominante, tais como: corridas curtas, corridas de meio-fundo, maratona, salto, corrida de ski (Barrey *et al.*, 1994). Em cavalos, falta demonstrar ainda, a existência de aspectos ligados à especialização para a corrida, tendo como foco a distribuição das fibras rápidas. O conhecimento dos principais fatores que influenciam a tipologia muscular no cavalo demonstra uma relativa importância da idade, do treinamento e também da genética. Os efeitos da raça do cavalo e de sua herdabilidade média são variáveis bem demonstradas em outras espécies de mamíferos e fortes argumentos em favor de uma significativa influência da origem genética sobre a composição de fibras rápidas e lentas na musculatura de eqüinos. Com o desenvolvimento de novas técnicas de caracterização da tipologia muscular, que permitam uma análise precisa, rápida, e a custo acessível, as aplicações genéticas desta metodologia mostram-se promissoras.

5.2 – Expressão da nNOS e atividade de nNOS

A expressão da nNOS em cerebelo de rato sadio apresentou uma controversa localização. Baader *et al.*, (1996) demonstraram a sua expressão em células em forma de cesto e em células granulosas, mas não em células de Purkinje. Em cerebelo de ratos submetidos a neurectomia unilateral do oitavo par craniano (vestibulococlear), Pisu *et al.* (2002) evidenciaram um aumento na expressão da nNOS nas células de Purkinje cerebelares contralaterais.

Uma extensa revisão na literatura não revelou nenhum trabalho envolvendo a expressão da nNOS em músculo esquelético eqüino. Assim,

acreditamos que o presente trabalho descreve pela primeira vez a expressão da isoforma nNOS em músculo esquelético eqüino, que pôde ser imunolocalizada usando-se anticorpo policlonal anti-nNOS de cérebro de coelho. Nossos resultados mostram que a nNOS no músculo glúteo médio de cavalos sedentários é expressa predominantemente nas áreas subsarcolemais, como acontece em outros mamíferos (Grozdanovic *et al.*, 2001; Planitzer *et al.*, 2001), sugerindo que esta proteína marcada por reação imunohistoquímica corresponde ao “splicing” alternativo da nNOS, denominado nNOS μ . A nNOS μ é conhecida por ser um componente do complexo glicoprotéico da distrofina, associada ao sarcolema das fibras musculares esqueléticas (Bredt 2003). Além disso, especialmente em cavalos treinados para enduro, o anticorpo anti-nNOS detectou a expressão de uma proteína com reatividade para nNOS na região citoplasmática. Considerando-se que não ocorra imunidade cruzada entre o anticorpo anti-nNOS produzido pela Transduction e as outras isoformas de NOS, é provável que esta proteína corresponda a um dos “splicings” alternativos da nNOS que são expressos no citoplasma, como a nNOS β e a nNOS γ , cujos peptídeos são muito parecidos com a nNOS e podem ser reconhecidos pelo anticorpo utilizado (Mungrue *et al.*, 2003).

Também foi demonstrado neste trabalho que cavalos treinados para resistência apresentam níveis mais altos de expressão de nNOS que os cavalos sedentários. Em ratos submetidos a treinamento de resistência um aumento de 300% na atividade da nNOS foi demonstrado por Vassilakopoulos e colaboradores (2003), enquanto que em humanos o exercício de resistência não induziu alterações na expressão da nNOS (Frandsen *et al.* 2000). Estes últimos autores não

encontraram mudanças significativas na expressão da nNOS em músculo esquelético de atletas humanos treinados durante seis semanas. Esta discrepância, com os resultados mostrados neste trabalho, poderia ser atribuída às diferenças metabólicas entre as espécies pois, em humanos a expressão da nNOS foi demonstrada apenas nas fibras do tipo I (Kobzik *et al.*, 1995), ou à aplicação de um estímulo insuficiente (protocolo de treinamento), incapaz de induzir alterações na tipologia muscular dos atletas humanos. Todos os cavalos pertencentes ao grupo treinado, usados neste estudo, foram treinados durante longos períodos e exibiam em seus registros desportivos experiência de alguns anos em competições de longa distância. Portanto, a expressão aumentada da nNOS no grupo de cavalos treinados parece constituir uma adaptação muscular induzida pelo treinamento de resistência, cujas possíveis e prováveis implicações fisiológicas do NO sobre o músculo esquelético em condições de exercício, levantam inúmeros e intrigantes questionamentos.

Nas fibras musculares esqueléticas eqüinas foi também observada uma distribuição heterogênea da nNOS. Diferentemente da expressão da nNOS em músculo esquelético de humanos (Frandsen *et al.*, 1996) e similar ao descrito em roedores (Kobzik *et al.*, 1995), a expressão da nNOS em músculo equino foi maior nas fibras de contração rápida, ou seja, as do tipo II. Uma alta expressão da nNOS nas fibras oxidativas e glicolíticas do tipo IIA em músculo eqüino, coincide com os resultados demonstrados em músculo esquelético de rato (Planitzer *et al.*, 2001).

Uma expressão diferenciada da nNOS (e/ou de seu “splicing” alternativo, nNOS μ) em músculos esqueléticos sugere que o NO possa ter um

importante papel regulatório no metabolismo energético das fibras musculares. A comparação entre a expressão da nNOS e a tipologia das fibras musculares esqueléticas eqüinas evidenciou uma maior expressão desta enzima nas fibras mistas (oxidativas e glicolíticas) do tipo IIA e nas fibras híbridas do tipo IIAX. Esta distribuição da NOS poderia propiciar uma interessante ambígua regulação metabólica do óxido nítrico sobre as fibras musculares. Esta regulação seria dependente do tipo de estímulo neuronal. Sob estímulo de alta voltagem, o NO ao inibir a citocromo C oxidase, diminuindo a respiração mitocondrial, pode indiretamente estimular a glicólise e a via anaeróbia, favorecendo o trabalho de força. Neste sentido, um aumento na concentração de cGMP provoca um conseqüente aumento na utilização muscular da glicose (Stamler & Meissner, 2001). Por outro lado, sob estímulo de baixa voltagem, o NO pode bloquear parcial ou totalmente a glicólise ao inibir a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, diminuindo a capacidade contrátil do músculo, favorecendo a oxidação aeróbia de ácidos graxos e o exercício de resistência. Nesta outra linha de raciocínio, o NO inibe a formação das pontes cruzadas entre a actina e a miosina (Stamler & Meissner, 2001). Este paradoxal efeito do NO sobre a contratilidade muscular pode ser avaliado comparando-se os resultados descritos por (Kobzik *et al.*, 1994; Balon & Nadler, 1994) onde ao NO é atribuído o efeito de redução da força de contração muscular, enquanto nos experimentos conduzidos por Wang e colaboradores (2001), foi observada uma progressiva e severa redução na velocidade de deslocamento em ratos, quando a NOS foi inibida.

Um dos efeitos conhecidos do NO é a redução da força de contração

muscular. Porém, este é mais um dos inúmeros efeitos musculares do NO, cujas ações ainda estão sob intensa investigação. A inibição da glicólise nas fibras musculares do tipo II, e uma conseqüente redução no fornecimento de ATP, certamente é um destes mecanismos envolvido na redução da força de contração. Uma baixa, ou ausente, expressão de nNOS em fibras musculares oxidativas do tipo I, especialmente em indivíduos treinados para provas de resistência, provavelmente favoreceria o metabolismo oxidativo tanto de carboidratos como de ácidos graxos, pois as abundantes mitocôndrias destas fibras não seriam inibidas pelo NO produzido durante a contração muscular.

Os presentes resultados ainda sugerem que, um aumento na expressão da nNOS seria uma adaptação fisiológica (bioquímica) induzida no músculo esquelético equino pelo treinamento de resistência. Esta adaptação resulta em uma diferenciada e específica expressão da nNOS nos diferentes tipos de fibras musculares, sugerindo que, tipos diferentes de treinamento poderiam induzir diferentes adaptações, considerando-se a expressão da nNOS. Analisando-se nossos resultados e os comentários de Paxinou e colaboradores (2001) e de Silveira e colaboradores (2002), um aumento na expressão das isoformas da NOS seria um dos mecanismos enzimáticos desejáveis e resultante de um programa de treinamento de resistência onde o NO agiria como um antioxidante, evitando a formação do potente radical livre de oxigênio, o radical hidroxil (Paxinou et al., 2001). Neste aspecto, o significativo aumento observado na expressão da nNOS nas fibras do tipo II, especialmente a tipo IIA, que é a fibra muscular cuja população apresentou a maior diferença quando comparamos cavalos sedentários com treinados, e é a

fibra mais susceptível a modulações da plasticidade muscular (Staron & Pette 2001), poderia representar uma adaptação antioxidante induzida pelo treinamento de enduro. Diferentemente das fibras do tipo I, que em músculos predominantemente aeróbios como o músculo sóleo em ratos, apresenta uma alta atividade enzimática antioxidante, as fibras do tipo II, abundantes em músculo EDL de rato, não apresentam uma alta atividade enzimática antioxidante (Zoppi, 2004) que poderia ser suprida pela expressão da NOS. Uma explicação bastante plausível seria uma intensificação do estímulo adaptativo, sob condições de exercício, sobre as fibras do tipo IIA, que são predominantes na musculatura esquelética de eqüinos. Estas fibras seriam responsáveis pelo processo adaptativo no sentido de rápido para lento, e pelo aumento na exportação do NO que agiria tanto na vasodilatação e na sinalização das adaptações vasculares (neovascularização), como na diferenciação de células satélites.

Finalmente, o aumento de atividade NOS encontrada na fração particulada de homogenatos de músculo de cavalos treinados para enduro está em concordância com os resultados demonstrados por Nakane e colaboradores (1993) e Kobzik e colaboradores (1994). A parcial dependência de Ca^{2+} também vista na fração particulada das amostras do mesmo grupo de cavalos poderia indicar um aumento importante na expressão da isoforma independente de Ca^{2+} . Segundo Gath e colaboradores (1996), a isoforma induzível Ca^{2+} -independente (iNOS) é constitutivamente expressa na fração particulada, mas não na fração solúvel dos músculos diafragma e gastrocnêmio de porco da guiné, enquanto que, a nNOS também pode ser uma isoforma induzível (Reiser *et al.* 1997). Assim, a atividade de

NOS aumentada na fração particulada das amostras do grupo de cavalos treinados pode refletir um aumento de atividade de ambos os tipos de NOS, dependente e independente de Ca^{2+} . Porém, as abordagens utilizadas não permitiram esclarecer quais as isoformas de NOS tiveram suas atividades aumentadas pelo treinamento de resistência.

5.2.1 - Implicações fisiológicas e clínicas da expressão muscular da nNOS.

Envolvimento do sistema NO/NOS na lesão e na reparação muscular

O papel do sistema NO/NOS na lesão muscular e no mecanismo de reparo da lesão muscular é um novo campo de pesquisa sobre a fisiopatologia da miopatia induzida por esforço. É bastante conhecido o envolvimento da isoforma induzível da NOS (iNOS) e o aumento de sua expressão no processo inflamatório (Mac Micking *et al.*, 1997). A expressão da nNOS também apresentou-se aumentada em dano muscular provocado em esmagamento experimental (Rubinstein *et al.*, 1998). Andersen e colaboradores (2000) mostraram um efeito sinalizador do NO em células satélites de culturas de fibras musculares isoladas e "in vivo" (Andersen *et al.*, 2002). A ação ativadora do NO na diferenciação de células satélites musculares, tem óbvias e importantes implicações no mecanismo de reparação da lesão muscular. Os estudos farmacológicos deste efeito do NO poderia resultar em novos usos dos doadores de NO na terapia da miopatia induzida por esforço.

Analisados conjuntamente, a hipotética ação paradoxal antioxidante do NO e o aumento da expressão da nNOS em músculo esquelético equino, somente

na sub-população de fibras musculares glicolíticas do tipo II, levanta interessantes questões práticas. Durante a execução de programas de condicionamento físico, em fases onde protocolos de trabalho intenso são aplicados e durante desgastantes períodos de competição, está comprovado que o exercício predominantemente anaeróbio induz estresse oxidativo e por conseqüência aumenta o risco de lesão muscular. Nestas condições, o emprego de sessões de treinamento de resistência, constituído de longas distâncias em baixas velocidades, portanto sob condições aeróbias, poderia ter um efeito profilático sobre as lesões musculares? Durante períodos de recuperação pós-lesão muscular, o emprego de fisioterapia baseado em treinamento de resistência poderia acelerar a reparação muscular?

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

A análise conjunta dos resultados distingue, quanto à tipologia muscular e expressão da nNOS, dois diferentes fenótipos musculares, caracterizando um grupo de cavalos sedentário e outro treinado. Uma isoforma da nNOS, provavelmente o “splicing” alternativo componente do complexo distrofina ancorado à sarcolema, nNOS μ , é expresso e localizado diferenciadamente em músculo esquelético destes dois grupos de cavalos. A mais alta expressão da nNOS em fibras musculares de cavalos treinados sugere uma adaptação bioquímica induzida pelo treinamento de resistência, que certamente possui intrigantes implicações fisiológicas e pode influir determinantemente sobre o desempenho de cavalos atletas.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Alessio HM. & Goldfarb AH. (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptative response to training. *Journal of Applied Physiology* 64: 1333-1336.
- 2) Anderson JE. (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated satellite cell activation. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1859-1874.
- 3) Anderson J. & Pilipowicz O. (2002). Activation of muscle satellite cells in single-fiber cultures. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry* 7: 36-41.
- 4) Baader SL. & Schilling K., (1996). Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience* 16(4): 1440-1449.
- 5) Balon TW. & Nadler JL. (1997). Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 82: 359-363.
- 6) Bär A. & Pette D. (1988). Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscles. *FEBS Lett.* 235: 153-155.
- 7) Barrey E. (1994). Propriétés contractiles des fibres musculaires et performance physique chez le cheval. *INRA Prod. Anim.* 7(1): 41-53.
- 8) Barrey E., Valette JP., Jouglin M., Picard B., Geay Y. and Robelin J., (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for myosin chains in the horse. *Reproduction and Nutrition Development* 35: 619-628.
- 9) Barrey E., Valette JP., Jouglin M., Blouin C. and langlois B. (1999). Heritability of

percentage of fast myosin heavy chains in skeletal muscles and relationship with performance. *Equine Veterinary Journal – Supplement* 30: 289-92.

10) Bates TE., Loesch A., Burnstock G. and Clark JB. (1996). Mitochondrial nitric oxide synthase: A ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 218: 40-44.

11) Beckman JS, Beckman TW., Chen J., Marshall PA., and Freeman BA. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceeding of National. Academy of Science of the USA* 87: 1620-1624.

12) Beckman JS. & Koppenol WH. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology* 271: C1424-C1437.

13) Boffi FM., Cittar J., Balskus G., Muriel M., Desmaras E. (2002). Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Veterinary Journal – Supplement* 34: 275-278.

14) Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

15) Bredt DS. (2003). Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *Journal of Cell Science* 116: 9-15.

16) Bredt DS. & Snyder SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceeding of National Academy of Science of the USA* 87: 682-685.

17) Bredt DS. & Snyder SH., (1994). Nitric oxide: A physiological messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* 63: 175-195.

7 – Referências bibliográficas _____

- 18) Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC and Brecht DS. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767.
- 19) Brooke MH. & Kaiser KK. (1970b). Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: The nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 18: 670-672.
- 20) Capanni C., Squarzone S., Petrini S., Villanova M., Muscari C., Maraldi NM., Guarnieri C. and Caldarera CM. (1998). Increase of neuronal nitric oxide synthase in rat skeletal muscle during ageing. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 245: 216-219.
- 21) Chang KC. & Fernandes K. (1997). Developmental expression and 5’ end cDNA cloning of the porcine 2x and 2b myosin heavy chain genes. *DNA and Cell Biology* 16: 1429-1437.
- 22) Chao DS., Gorospe JR., Brenman JE., Rafael JA., Peters MF., Froehner SC., Hoffman EP., Chamberlain JS. and Brecht DS. (1996). Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *Journal of Experimental Medicine* 184: 609-618.
- 23) Chao DS., Silvagno F., Xia H., Cornwell TL., Lincoln TM. and Brecht DS., (1997). Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 76: 665-672.
- 24) Chao DS, Silvagno F, Brecht DS. (1998). Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem* 71: 784-789.

- 25) Chen LE., Silvano F., Xia H., Cornwel TL., Lincoln TM., and Bredt DS., (1997). Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 76: 665-672.
- 26) Christopherson KS. and Bredt DS. (1997). Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *Journal of Clinical Investigation* 100(10): 2424-2429.
- 27) Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, and Schapira AH. (1994). Reversible inhibition of cytochrome C oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Lett.* 345: 50-54.
- 28) Cooper CE. (2002). Nitric oxide and cytochrome oxidase. Substrate, inhibitor or effector. *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(1): 33-39.
- 29) Cork RJ., Perrone ML., Bridges D., Wandell J., Scheiner CA., Mize RR., (1998). A web-accessible digital atlas of distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain. *Nitric oxide in brain development, plasticity and disease progress in brain research*, 118: 37-50.
- 30) Davies KJA., Quintanilha AT., Brooks GA. and Packer L., (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemistry and Biophysic Research Communication.* 107: 1198-1205.
- 31) Dubowitz V. & Brooke MH. *Muscle Biopsy: A Modern Approach* 1973, Saunders.
- 32) Elfering SL., Sarkela TM., and Giulivi C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 277(41): 38079-38086.
- 33) Endo T., Imaizumi T., Tagawa T., Shiramoto M., Ando S. and Takeshita A., (1994). Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. *Circulation.* 90: 2886-2890.

- 34) Essig DA & Nosek TM., (1997). Muscle fatigue and induction of stress proteon genes: A dual function of reactive oxygen species. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 22(5): 409-428.
- 35) Eu JP., Sun J., Xu L., Stamler JS. and Meissner G., (2000). The skeletal calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*. 102: 499-509.
- 36) Farber JL., Kyle M. and Coleman JB., (1990). Biology of disease – Mecanisms of cell injury by activated oxygen species. *Laboratory Investigation*, 62: 670-679.
- 37) Farr AG and Nakane PK. (1981). Immunohistochemistry with enzyme labelled antibodies. *J. Immunol. Meth.* 47: 129.
- 38) Feron O., Dessy C., Opel DJ., Arstall MA., Kelly RA., and Michel T., (1998). Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 30249-30254.
- 39) Fink WJ., Costill DL., Pollock ML., (1977). Submaximal and maximal worging capacity of elite distance runners. Part II. Muscle fiber composition and enzyme activities. *Annals of New York Academie of Science*. 301: 323-327.
- 40) Fitts RH. (1994). Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiology Review*, 74(1): 49-94.
- 41) Flück M & Hoppeler H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 146: 159-216.
- 42) Folland JP., Mass H., and Jones DA., (2000). The influence of nitric oxide in human skeletal muscle properties. *Acta Physiol. Scand.*, 169(2): 141-148.

- 43) Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M and Murad F. (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1849-1857.
- 44) Foster MW, McMahon TJ and Stamler JS. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 9(4):160-168.
- 45) Frandsen U, Lopez-Figueroa M, and Hellsten Y. (1996). Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227: 88-93.
- 46) Frandsen U, Hoffner L, Betak A, Saltin B, Bangsbo J, and Hellsten Y. (2000). Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 89: 1033-1038.
- 47) Garthwaite J. & Boulton CL. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*. 57: 683-706.
- 48) Gath I, Closs EI, Godtel-Armbrust U, Schmitt S, Nakane M, Wessler I, Förstermann U. (1996). Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J.* 10: 1614-1620.
- 49) Gondim F., Silveira LR., Pereira-da-Silva L. and Macedo DV. (2000). Oxidative stress and antioxidant systems in horses. *Conference on Equine Sports Medicine And Science, CESMAS 2000 Proceeding*.
- 50) Gottlieb-Vedi M. (1988). Circulatory and muscle metabolic responses to draught work of varying intensity and duration in Standardbred horses. Thesis, Faculty of veterinary medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

- 51) Griffith OW. & Stuehr DJ. (1995). Nitric oxide synthase: Properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology*. 57:707-736.
- 52) Grozdanovic Z. (2001). NO Message from muscle. *Microscopy Research and Technique* 55: 148-153.
- 53) Grozdanovic Z, Nakos G, Dahrmann G, Mayer B, Gossrau R. (1995). Species-independent expression of nitric oxide synthase in the sarcolemma region of visceral and somatic striated muscle fibers. *Cell Tissue Res*. 281: 493-499.
- 54) Grozdanovic Z., Christova T., Gosztanyi G., Mellerowicz H., Blottner D, and Gossrau R., (1997). Absence of nitric oxide synthase I despite the presence of the dystrophin complex in human striated muscle. *Histochemical Journal*. 29: 97-104.
- 55) Guo Y., El Dwairi Q., Ward ME., Hussain SNA. (1996). Upregulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase isoforms in response to in-vivo subacute hypoxia. *Circulation*, 94(8): 3444 (supplement).
- 56) Guo Y., Geenwood MT., Petrof BJ. and Hussain SN. (1999). Expression and regulation of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in ventilatory muscles. *American Journal of Respiratory, Cellular and Molecular Biology*. 20: 319-326.
- 57) Guth L. & Samaha FJ. (1970). Procedure for hisyochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Experimental Neurology*. 28:365-367.
- 58) Harrison DG. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfuction. *Journal of Clinical Investigation*. 100 (09): 2153-2157.
- 59) Hevel JM., White KA. and Marletta MA. (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase identification as a flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 22789-22791.

- 60) Huk I., Nanobashvili J., Neumayer C., Punz A., Mueller M., Afkhangpour K., Mittlboeck M., Losert U., Polterauer P., Roth E., Patton S. And Malinski T. (1997). L-Arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 96: 667-675.
- 61) Hussain SN, El-Dwairi Q, Abdul-Hussain MN, Sakkal D. (1997). Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. *J.Appl. Physiol.* 83: 348-353.
- 62) Imlay JA. & Linn. S., (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302.
- 63) Jaffrey SR. & Snyder SH, (1996). PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* 274: 774-777
- 64) Jaffrey SR., Snowman AM., Eliasson MJ., Cohen NA., and Snyder SH., (1998). CAPON: A protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron.* 20: 115-124.
- 65) Jenkins RR. & Goldfarb A. (1993). Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 25: 210-212.
- 66) Ji LL. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science in Sports and Exercise,* 25(2): 225-231.
- 67) Kadi F. & Thornell LE, (1999). Training affects myosin heavy chain phenotype in the trapezius muscle of women. *Histochem. Cell Biol.* 112:73-78
- 68) Kadi F. & Thornell LE, (2000). Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochem. Cell Biol.* 113: 99-103.

- 69) Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH, Marette A. (1997). Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-1700.
- 70) Katsuki S., Arnold W., Mittal C. and Murad F., (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *Journal of Cyclic Nucleotide Research*. 3: 23-35.
- 71) King CE, Melnyshyn MJ, Mewburn JD, Curtis SE, Winn MJ, Cain SM, Chapler CK. (1994). Canine hindlimb blood flow and O_2 uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J. Appl. Physiol.* 76: 1166-1171.
- 72) Klebl B.M., Ayoub A.T. and Pette D. (1998). Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Letters*. 422: 381-384.
- 73) Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, and Stamler JS. (1994) .Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548.
- 74) Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB and Stamler JS. (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211-2: 375-381.
- 75) Kröncke KD., Fehsel K. and Kolb-Bachofen V., (1997). Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1: 107-120.
- 76) Lau KS., Grange RW., Chang WJ., Kamm KE., Sarelius I. and Stull JT., (1998). Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular

smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide. *FEBS Letters*. 431: 71-74.

77) Lau KS., Grange RW., Isotani E. *et al.*, (2000). nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. *Physiol. Genomics* 2: 21-27.

78) Larsson L., Edstrom, L., Lindergren, B., Gorza, L. and Schiaffino, S. (1991). Myosin heavy chain composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *American Journal of Physiology*. 261 (Cell Physiology. 30): C93-C101.

79) Leone AM., Palmer RMJ., Knowles RG., Francis PL., Ashton DS. and Mocanda S. (1991) Constitutive and inducible nitric oxide synthases are L- arginine N^G - C^G - dioxxygenases. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 23790-23795.

80) Lopez-Rivero JL., Morales-Lopez JL., Galisteo AM., Aguera E. (1991). Muscle fiber type composition in untrained and endurance-trained Andalusian and Arab horses. *Equine Vet. J.* 23: 91-93.

81) Lopez-Rivero JL., Aguera E., Monteverde JG., Vivo J., Rodriguez-Barbudo MV., (1992). Skeletal muscle fiber size in untrained and endurance-trained horses. *American Journal of Veterinary Research*. 53(5): 847-50.

82) Lowenstein CJ., Alley EW., Raval P., Snowman AM., Snyder SH., Russel SW. and Murphy WJ. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene - two upstream regions mediate induction by interferon-gamma and lipopolysacharide. *Proceeding of National Academy of Science of the USA*. 90: 9730-9734.

83) Machado ABM., (1981). Estrutura e funções do cerebelo. Neuroanatomia Funcional. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro.

- 84) MacMicking J, Qiao WX and Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323- 350.
- 85) Mahdavi V., Izumo S., Nadal-Ginard B., (1987). Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ. Res.* (60): 804-814.
- 86) Marletta MA., (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 268: 12231-12334.
- 87) Mayer B., John M. and Böhme E. (1990). Purification of calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Letters.* 227: 215-219.
- 88) Mayer B., John M., Heinzl B., Werner ER., Wachter H., Schultz G. and Bohme E. (1991). Brain nitric oxide synthase is a biopterin-and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Letters.* 288: 187-191.
- 89) Mayer B. & Hemmens B. (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Tibs.* 22: 477-481.
- 90) Michel T and Feron O. (1997). Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? *J. Clin. Invest.* 100(9): 2146-2152.
- 91) Mikesky AE., Giddings CJ., Mattheus W., Gonyea WJ., et al. (1991). Change in muscle fiber size and composition in response to heavy-resistance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (19): 266-274.
- 92) Mills PC., Smith NC., Casas I., Harris P., Harris RC., Marlin DJ., (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.* 74(1-2): 60-66.

- 93) Mills PC., Higgins AJ. (1997). Oxidant injury, nitric oxide and pulmonary vascular function: Implications for the exercising horse. *Veterinary Journal*. 153(2): 125-148.
- 94) Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, and Salgado I. (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *Meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* 130: 1288-1297.
- 95) Moncada S., Palmer RMJ. and Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Pharmacological Review*. 43: 109-112.
- 96) Mohr S, Stamler JS, Brune B. (1996). Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J. Biol. Chem*. 271: 4209-4214.
- 97) Moncada S., Higgs A. and Furchgott R. (1997). XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacological Review*. 49 (2): 137-142.
- 98) Moro MA., Darley-Usmar VM., Goodwin DA., Read NG., Zamora-Pino R., Feelisch M., Radomski MW. and Moncada S. (1994). Paradoxal fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proceeding of National Academy of Science of the USA*. 91: 6702-6706.
- 99) Mungrue N, Bredt DS, Stewart DJ, and Husain M. (2003). From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol. Scand*. 179: 123-135.
- 100) Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U and Murad F. (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS lett*. 316: 175-180.

- 101) Nathan C. and Xie QW. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 13725-13728.
- 102) Natan C. and Xie QW. (1994). Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell.* 78: 915-918.
- 103) Nozaki K., Moskowitz MA., Maynard KI. et al. (1993). Ossible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metb.* (13): 70-79.
- 104) Paxinou E, Weisse M, Chen Q, Souza JM, Hertkorn C, Selak M, Daikkin E, Yudoff M, Sowa G, Sessa WC, and Ischiropoulus H. (2001). Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress. *PNAS* 20: 11575-11580.
- 105) Perkins WJ., Han YS. and Sieck GC. (1997). Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *Journal of American Physiology Society.* 1326.
- 106) Pette D. & Staron RS. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews on Physiological Biochemistry and Pharmacology.* 116: 1-76.
- 107) Pette D. & Staron RS. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *International Review of Cytology* 170: 143-223.
- 108) Pette D. & Staron RS. (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.* 2001, 115: 359-372.
- 109) Pette D. & Vrbová G., (1992). Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Reviews on Physiological Biochemistry and*

Pharmacology. 120: 115-202.

110) Pisu MB., Conforti E., Botta L., Valli P. and Bernocchi G. (2002). Nitric oxide synthase in the frog cerebellum: Response of Purkinje neurons to unilateral eighth nerve transection. *Anatomical Record*, 268(1): 73-83.

111) Planitzer G, Miethke A and Baum O. (2001). Nitric oxide synthase-1 is enriched in fast-twitch oxidative myofibers. *Cell Tissue Res*. 306: 325-333.

112) Pollock JS, Förstermann U, Mitchel JA, Warner TD, Schimidt HH, Nakane M and Murad F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10480-10484.

113) Pollock JS., Klinghofer V., Förstermann U. and Murad F., (1992). Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Letters*. 309: 402-404.

114) Rando TA. (2001). Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: A “Two hit” hypothesis, of the cause of muscle necrosis. *Microscopy Research and Technique* 55(4): 223-235.

115) Reid MB. (1996). Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol. Sci.* 11: 114-121.

116) Reiser PJ., Moss RL., Giulian GG. and Greaser ML. (1985). Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *Journal of Biological Chemistry*. 260: 9077-9080.

117) Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL. (1997). Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J. Appl. Physiol.*, 82: 1250-1255.

- 118) Ress DD, Cunha FQ, Assreuy J, Herman AG, Moncada S. (1995). Sequential induction of nitric-oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. *Br J Pharmacol*. 114: 689-693.
- 119) Rivero JLL. (1996). Muscle biopsy as a tool for assessing muscular adaptation to training in horses. *American Journal of Veterinary Research* 57(10): 1412-1416.
- 120) Rivero JLL, Serrano AL, Henckel P, Aguera E. (1993). Muscle fiber type composition and fiber size in successfully and unsuccessfully endurance-raced horses. *Journal of Applied Physiology* 161: 1758-1766.
- 121) Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. (1996 A). Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: An imunohistochemical and electrophoretic study. *Anatomical Record* 246: 185-194.
- 122) Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. (1996 B). Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the Influence of training. *Anatomical Record* 246: 195-207.
- 123) Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. (1997). A sensitive eletrophoretic method for the quantification of myosin heavy chain isoforms in horse skeletal muscle: Histochemical and immunocytochemical verifications. *Eletrophoresis* 18(11): 1967-1972.
- 124) Rivero JL., Serrano AL., Barrey E., Valette JP. and Jouglin M., (1999). Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 20(2): 211-21.

- 125) Hodgson DR. & Rose RJ. (1994). Muscle anatomy, physiology, and adaptations to exercise and training. *The Athletic Horse*. Saunders. Sidney.
- 126) Roneus M. (1993). Muscle characteristics in Standardbreds of different ages and sexes. *Equine Vet. J.*, 25: 143-146.
- 127) Roneus M. & Lindholm A. (1991). Muscle characteristics in Thoroughbreds of different ages and sexes. *Equine Vet. J.*, 23: 207-210.
- 128) Rubinstein I., Abassi Z., Coleman R., Milman F., Winaver J. and Better OS., (1998). Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *Journal of Clinical Investigation*. 101: 1325-1333.
- 129) Rusche KM., Spiering MM. and Marletta MA., (1998). Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 37: 15503-15512.
- 130) Salvemini D., Misko TP., Masferrer JL., Seibert K., Currie MG. and Needleman P. (1993). Nitric-oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proceeding of National Acad of Sci of the USA*. 90(15): 7240-7244.
- 131) Sandri M, Carraro U, Okolov MP, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C. (1995). Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and *mdx* muscle fibers after exercise. *FEBS Letters* 373. 291-295.
- 132) Sasa KMT. (1997). Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Cardiovascular Medicine*. 7: 28-37.
- 133) Schiaffino S. & Reggiani C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 77: 493-501.
- 134) Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K. and Lomo T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle

fiber. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* . 10: 197-205.

135) Schmidt HHHW., Pollock JS., Nakane M., Gorsky LD., Förstermann U. and Murad F. (1991). Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proceeding of National Acad of Science of the USA*. 88: 365-369.

136) Schultz E. & McCormick KM. (1994). Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123: 213-257.

137) Segal SS., Bredt SE., Sessa WC. (1999). Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 277: 1167-1177.

138) Serrano AL., Petrie JL., Rivero JLL., and Hermanson JW. (1996). Myosins isoforms and muscle fiber characteristics in equine gluteus medius muscle. *The Anatomical Record* 244: 444-451.

139) Serrano AL. & Rivero JL. (2000). Myosin heavy chain profile of equine gluteus medius muscle following prolonged draught-exercise training and detraining. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 21(3): 235-45.

140) Serrano AL, Quiroz-Rothe E, Rivero JLL. (2000). Early and long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Pflug. Arch. Eur. Phy.* 441(2-3): 263-274.

141) Silvagno F., Houhui Xia, and Bredt DS. (1996). Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *The Journal of biological Chemistry* 271(19): 11204-11208.

142) Silveira RS., Pereira-Da-Silva L., Juel C. and Hellsten Y., (2003). Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions.

Free Radical Biology & Medicine, 35(5): 455-464.

143) Snow DH. and Guy PS. (1976). Percutaneous needle muscle biopsy in the horse. *Equine Veterinary Journal*. 8: 150-155.

144) Stadler J., Harbrecht BG., Disilvio M., Curran RG., Jordan ML., Simmons RL. and Billiar TR. (1993). Endogenous nitric-oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenases products and interleukin 6 by rat kupffer cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 53 (2): 165-172.

145) Stamler JS., Singel DJ., and Loscalzo J. (1992). Biochemistry of Nitric Oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1853-2008.

146) Stamler JS. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 78: 931-936.

147) Stamler JS., Jia L., Eu JP., McMahon TJ., Demchenko IT., Bonaventura J., Gernert K. and Piantadosi CA. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 276: 2034-2037.

148) Stamler JS. & Hausladen A. (1998). Oxidative modifications in nitrosative stress. *Natural and Structural Biology*. 5: 247-249.

149) Stamler JS. (1999). Nitric oxide in the cardiovascular system. Review in depth. In: *Nitric Oxide in the Cardiovascular System*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 273.

150) Stamler JS. & Meissner G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews* 81(1): 209-237

- 151) Staron RS., Kraemer WJ., Hikida RS., Fry AC., Murray JD., Campos GER. (1999). Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochemistry and Cell Biology* 111: 117-123.
- 152) Stuehr DJ. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 339-359.
- 153) Stuehr DJ., Cho HJ., Know NS., Weise MF. and Nathan CF. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proceeding of National Academy of Science of the USA.* 88: 7773-7777.
- 154) Szabó C. & Ohshima H. (1997). DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 1 (5): 373-385.
- 155) Tamaki T., Uchiyama S., Nakano S. (1992). A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med. Sci.Sports Exerc.*, 24(8): 881-886.
- 156) Tayeh MA. & Marletta MA. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 264: 19654-19658.
- 157) Tews DS., Goebel HH., Schneider I, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. (1997). Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 56: 1283-1289.
- 158) Thomason DB., Baldwin KM. and Herrick RE. (1986). Myosin isozyme distribution in rodent hindlimb skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 60(6): 1923-1931.

- 159) Tidball JG., Lavergne E, Lau KS., Spencer MJ., Stull JT. and Wehling M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1998, 275 (*Cell Physiol.* 44): C260-C266.
- 160) Vassilakopoulos T., Deckman G., Kebbewart M., Rallis G., Harfouche R., and Hussain SNA. (2003). Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *American Journal of Physiology Lung Cell Mollecular Physiology* 284: L452-L457.
- 161) Vane JR., (1994). The croonian lecture, 1993-the endothelium-maestro of the blood-circulation. *Philos. T. Royal Society of London B.* 343 (1304): 225-246.
- 162) Viner RI., Ferrington DA., Huhmer AF., Bigelow DJ., and Schoneich C. (1996). Accumulation of nitrotyrosine on the SERCA2a isoform of SR Ca-ATPase of rat skeletal muscle during aging: A peroxynitrite-mediated process? *FEBS Letters.* 379: 286-290.
- 163) Xie QW., Whisnant R. and Nathan C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine.* 177: 1779-1784.
- 164) Xu L., Eu JP., Meissner G. and Stamler JS. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 279: 234-237.
- 165) Xu KY., Huso DL., Dawson TM., Bredt DS. And Becker LC. (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 657-662.

7 – Ref er ências bibliogr áf icas_____

166) Yang CC., Alvarez RB., Engel WK., Haun CK. and Askanas V. (1997). Immunolocalization of nitric oxide synthase at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junctions: light and electron microscopic studies. *Exp. Neurol.* 148:

34-44.

167) Young ME., Radda GK., Leighton B. (1997). Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem. J.* 322: 223-228.

168) Wang MX., Murrell DF., Szabo C, Warren RF., Sarris M, Murrell GAC. (2001). Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* 5(3): 219-232.

169) Winder WN., Baldwin KM. and Holloszy JO. (1974). Enzymes involved in ketone utilization in different types of muscles: Adaptations to exercise. *European Journal of Biochemistry.* 47: 461-467.

170) Wolosker H., Panizzutti R. and Engelender S., (1996). Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Letters.* 392: 274-276.

171) Zoppi CC., (2004). Efeitos do treinamento e do “overtraining” no metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes e HSP72 em diferentes fibras musculares. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP.

APÊNDICE

8 - Apêndice I

GS 1	% MIOSINAS		% FIBRAS	ÁREA (μm^2)	CARACTERÍSTICAS
<i>MyHC I</i>	30,3	I	24,8	2478	7 anos
<i>MyHC IIa</i>	56,6	IIA	45,8	2331	castrado
<i>MyHC IIx</i>	13,1	IIAX	4,0	1874	390 kg
		IIX	25,4	2504	ñ treinou
GS 2					
<i>MyHC I</i>	23,8	I	31,3	1545	8 anos
<i>MyHC IIa</i>	50,8	IIA	48,3	1986	castrado
<i>MyHC IIx</i>	25,4	IIAX	1,4	2252	380 kg
		IIX	19,0	2168	ñ treinou
GS 3					
<i>MyHC I</i>	13,1	I	14,1	1831	4 anos
<i>MyHC IIa</i>	30,3	IIA	22,3	2139	Fêmea
<i>MyHC IIx</i>	56,6	IIAX	4,9	2696	390 kg
		IIX	58,7	2532	ñ treinou
GS 4					
<i>MyHC I</i>	27,2	I	27,2	1776	6 anos
<i>MyHC IIa</i>	48,1	IIA	40,1	2300	Fêmea
<i>MyHC IIx</i>	24,7	IIAX	6,0	3002	400 kg
		IIX	26,7	2848	ñ treinou
GS 5					
<i>MyHC I</i>	25,6	I	26,6	1796	7 anos
<i>MyHC IIa</i>	61,8	IIA	52,7	2500	Fêmea
<i>MyHC IIx</i>	12,6	IIAX	5,2	2345	410 kg
		IIX	15,5	2473	ñ treinou
GS 6					
<i>MyHC I</i>	24,7	I	25,7	1708	6 anos
<i>MyHC IIa</i>	36,6	IIA	28,5	1974	Fêmea
<i>MyHC IIx</i>	38,7	IIAX	5,1	2099	420 kg
		IIX	40,7	2290	ñ treinou
GS 7					
<i>MyHC I</i>	7,0	I	7,0	1850	7 anos
<i>MyHC IIa</i>	33,6	IIA	33,6	2124	castrado
<i>MyHC IIx</i>	59,4	IIAX	2,0	1800	450 kg
		IIX	57,4	2379	ñ treinou
GS 8					
<i>MyHC I</i>	30,4	I	31,4	1704	10 anos
<i>MyHC IIa</i>	41,5	IIA	36,0	1988	castrado
<i>MyHC IIx</i>	28,1	IIAX	4,5	2344	440 kg
		IIX	28,1	2429	ñ treinou
GS 9					
<i>MyHC I</i>	38,1	I	38,1	1633	10 anos
<i>MyHC IIa</i>	55,3	IIA	46,3	1834	garanhão
<i>MyHC IIx</i>	6,6	IIAX	4,0	2335	400 kg
		IIX	11,6	2280	ñ treinou

Resultados dos cavalos do grupo sedentário (GS) apresentando os valores percentuais relativos das isoformas de *MyHC* e da distribuição das fibras dos tipos I, IIA, IIAX e IIX, e os valores das áreas de secção transversal média de 50 fibras de cada tipo. Características físicas estão descritas na coluna “características”.

8 - Apêndice II

GT 1	% MIOSINAS		% FIBRAS	ÁREA (μm^2)	CARACTERÍSTICAS
<i>MyHC I</i>	24,4	I	25,5	1832	11 anos
<i>MyHC IIa</i>	52,6	IIA	49,1	1988	castrado
<i>MyHC IIx</i>	24,0	IIAX	5,0	1947	390 kg
		IIX	20,4	2173	5 anos de treino
GT 2					
<i>MyHC I</i>	38,7	I	38,4	1876	11 anos
<i>MyHC IIa</i>	37,4	IIA	34,4	2430	castrado
<i>MyHC IIx</i>	23,9	IIAX	6,3	2321	430 kg
		IIX	20,9	2597	3 anos de treino
GT 3					
<i>MyHC I</i>	34,6	I	35,6	2129	10 anos
<i>MyHC IIa</i>	62,3	IIA	58,3	2623	fêmea
<i>MyHC IIx</i>	3,1	IIAX	3,1	2877	380 kg
		IIX	3,0	2693	5 anos de treino
GT 4					
<i>MyHC I</i>	26,8	I	27,1	1596	9 anos
<i>MyHC IIa</i>	64,1	IIA	60,8	2428	castrado
<i>MyHC IIx</i>	9,1	IIAX	3,1	3145	380 kg
		IIX	9,0	2516	4 anos de treino
GT 5					
<i>MyHC I</i>	30,7	I	31,8	1970	9 anos
<i>MyHC IIa</i>	56,8	IIA	50,0	1966	castrado
<i>MyHC IIx</i>	12,5	IIAX	9,7	1327	370 kg
		IIX	8,5	2110	4 anos de treino
GT 6					
<i>MyHC I</i>	14,9	I	15,9	1919	6 anos
<i>MyHC IIa</i>	42,6	IIA	40,6	2235	castrado
<i>MyHC IIx</i>	42,5	IIAX	5,0	2409	400 kg
		IIX	38,5	2777	1 anos de treino
GT 7					
<i>MyHC I</i>	18,7	I	20,0	2176	9 anos
<i>MyHC IIa</i>	71,0	IIA	66,3	2322	fêmea
<i>MyHC IIx</i>	10,3	IIAX	6,7	2210	450 kg
		IIX	7,0	2467	2 anos de treino
GT 8					
<i>MyHC I</i>	42,3	I	43,3	2071	9 anos
<i>MyHC IIa</i>	53,3	IIA	50,3	2129	castrado
<i>MyHC IIx</i>	4,4	IIAX	2,0	2415	400 kg
		IIX	4,4	2100	3 anos de treino
GT 9					
<i>MyHC I</i>	27,3	I	24,7	1641	9 anos
<i>MyHC IIa</i>	66,4	IIA	63,9	1871	castrado
<i>MyHC IIx</i>	6,3	IIAX	7,0	2100	460 kg
		IIX	4,4	1815	3 anos de treino

Resultados dos cavalos do grupo treinado (GT) apresentando os valores percentuais relativos das isoformas de MyHC e da distribuição das fibras dos tipos I, IIA, IIAX e IIX, e os valores das áreas de secção transversal média de 50 fibras de cada tipo. Características físicas e atléticas também estão descritas.

Trabalho submetido ao
Canadian Journal of Veterinary Research

nNOS is heterogeneously distributed in equine myofibers with higher expression in endurance trained horses

Fernando J. G. Peixoto, Luzia V. Modolo, I. Salgado

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, SP, Brazil

Address all correspondence and reprint requests to Dr. Ione Salgado, telephone: (55) 19-3788-6149; fax: (55) 19-3788-6129; e-mail: ionesm@unicamp.br

Running head: *nNOS expression in equine skeletal myofibers.*

nNOS is heterogeneously distributed in equine myofibers with higher expression in endurance trained horses

Fernando J. G. Peixoto, Luzia V. Modolo, I. Salgado

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, SP, Brazil

Address all correspondence and reprint requests to Dr. Ione Salgado, telephone: (55) 19-3788-6149; fax: (55) 19-3788-6129; e-mail: ionesm@unicamp.br

Running head: *nNOS expression in equine skeletal myofibers.*

Abstract

Mammalian skeletal muscle expresses splice variants of neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Skeletal muscles have a metabolically heterogeneous population of myofibers, and fiber composition in equine skeletal muscle is correlated with athletic ability in endurance events. In this study, we investigated whether nNOS expression in equine skeletal muscle is related to fiber type and endurance training. Biopsy samples obtained from the *gluteus medius* muscle of sedentary- (SH) and endurance-trained (TH) horses were examined for the electrophoretic mobility of myosin heavy chain (MHC) and NOS activity. Serial tissue cross-sections were stained for myosin ATPase and NADH reductase, and also immunostained for nNOS. The *gluteus medius* muscle of TH had higher levels of nNOS expression and activity when compared to muscle from SH. In SH, nNOS was restricted to the subsarcolemmal area while in TH nNOS was also present at cytoplasmic sites. nNOS was heterogeneously distributed among the different myofibers, its expression being higher in fast-oxidative type IIA fibers than in fast-glycolytic type IIX fibers and absent in slow-twitch type I fibers. TH had a significantly higher relative content of fast-oxidative (type IIA) fibers, a greater oxidative capacity and a lower percentage of fast-glycolytic, type IIX fibers when compared with SH. The differences in muscle typology between the two groups of horses reflected alterations that probably resulted from the endurance training program. The overall results show that nNOS is differentially expressed and localized in the *gluteus medius* muscle according to the fiber type and the athletic conditioning of the horses.

Keywords: nitric oxide synthase / NOS expression / equine skeletal muscle / muscle fiber typing / endurance training

Introduction

The radical nitric oxide (NO), identified in the late 1980s as endothelium-derived relaxing factor (EDRF), was soon recognized as a signaling molecule able to control and influence a variety of important processes in mammals (1). More recently, skeletal muscle has emerged as a paradigm for NO function and redox-related signaling in biology (reviewed by 2).

The main mechanism for NO production in mammals is through the enzyme nitric oxide synthase (NOS) (EC.1.14.13.39), which uses the amino acid L-arginine and molecular oxygen to generate L-citrulline and NO (reviewed by 3). Because NO is a gaseous free radical and highly diffusible, its formation must be tightly regulated to control its synthesis and to specify its signaling. Indeed, NOS activity is controlled by a variety of mechanisms, including transcriptional and translational regulation, post-translational modifications and protein interactions that control NO biosynthesis (3).

Three distinct mammalian NOS isoforms have been purified and cloned, and represent the products of three distinct genes (2). These enzymes were originally designated nNOS, iNOS and eNOS according to the particular cell type (neurons, macrophages, and endothelial cells, respectively) in which they were initially discovered (4). However, more recent studies have shown that the NOS isoforms have a wide tissue distribution (5) and alternative splicing mechanisms are important in the pattern of NOS expression (reviewed by 6).

All major NOS isoforms are expressed in skeletal muscle, and a splice variant of nNOS, known as nNOS μ , is also specifically expressed in mature skeletal muscle and heart (3). nNOS μ is a component of the dystrophin glycoprotein complex that is associated with the sarcolemma of skeletal muscle fibers.

The ubiquitous nature of NOS expression and NO production in skeletal muscle fibers, where nNOS is more highly expressed than in any other tissue (2) suggests an important role for NO in muscle physiology. One of the most important effects of NO in skeletal muscle, especially during exercise, is in regulating the force of contraction since there is a progressive and severe reduction in walking speed in rats in which NOS is inhibited (7). The implications of NO release and its effects under different conditions of exercise are still not fully understood. Nevertheless, the interaction of the second messenger cGMP with ion channels, such as the ryanodine receptors of calcium channels and SR-calcium-ATPase (3), are well known. The activation of glucose and oxygen uptake (2), and the inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (8) and mitochondrial respiration (9), are other functions attributed to nNOS-derived NO in myofibers.

Skeletal muscle consists of a heterogeneous population of fibers characterized by specific myosin heavy chain (MHC) isoforms. The assignment of nNOS to a defined skeletal muscle fiber-type has been extensively discussed. Some investigations have demonstrated nNOS expression either exclusively (10) or predominantly (2,11) in fast-twitch (type II) myofibers of rodents. However, others have found no preferred expression of nNOS in a specific myofiber subtype but an almost ubiquitous distribution in skeletal muscle fibers (2). In the human *vastus lateralis* muscle, nNOS is apparently restricted to slow-twitch (type I) myofibers (2,12) while in rodents image analysis has shown that the nNOS-specific diaphorase activity of the sarcolemma (13) is significantly higher in fast-twitch oxidative (IIA) myofibers than in fast-glycolytic and slow-oxidative fibers (14). Although the specific compartmentalization of nNOS in skeletal muscle may vary among species, these variations may also result from the different states of muscle performance that are known to alter the myofibril composition (reviewed by 15).

Mammalian skeletal muscle is an extremely heterogeneous tissue and can adapt to

variations in contractile activity, substrate availability and environmental factors (reviewed by 16). Fiber type transitions are apparently the basis for this adaptive responsiveness. The most important molecular change in myofibril phenotype and in the contractile properties of skeletal muscle induced by training is the expression of myosin heavy chain (*MHC*) isoforms (15). In horses (17), and humans (18), three isoforms of *MHC*, (*MHC I*, *Ila* and *IIX*) are expressed in adult skeletal muscle and define muscle fiber types I, IIA and IIX.

The overall effect of exercise training is a fast-to-slow fiber transition in muscle plasticity, with an increase in the expression of *MHC Ila* and a decrease in the expression of *MHC IIX*. In addition, many oxidative adaptations, such as an increase in capillary density, in the number of mitochondria and in the glycogen content, have also been described (15,16,19). Endurance training induces more extensive aerobic-oxidative adaptations in the skeletal muscle of many mammalian species than do other types of exercise. Consequently, there is an increase in the relative distribution of aerobic-oxidative and glycolytic type IIA myofibers, while the number of glycolytic type IIX myofibers decreases (15,16,19,20).

A four-fold increase in the NOS activity of skeletal muscle was detected in rats after endurance training on a treadmill (21). Chronic electrical stimulation in rabbits also increased nNOS expression (2). In contrast, endurance training for six weeks did not alter the nNOS expression in human athletes (12).

In view of the lack of information in literature on the correlations between the NOS expression and the muscle type with the exercise in equines, in this study we compared the myosin heavy chain expression and fiber type distribution in the *gluteus medius* muscle of sedentary and endurance-trained horses. Then, we examined the effect of endurance training on NOS expression and distribution among the different fiber types of equine skeletal muscle.

Materials and Methods

Animals

Eighteen clinically healthy Arabian horses were divided into two groups, one consisting of nine gelding male and female sedentary horses (SH) 4-10 years old and the other consisting of nine gelding male and female trained horses (TH) 6-11 years old. The horses in the SH group had never been trained for any type of equestrian competition while all of the horses in the TH group had extensive experience in long-distance (80-160 Km) riding competitions.

Muscle biopsy and tissue processing

Muscle biopsies (~50 mg) were obtained from the superficial region (depth of ~5 cm) of the left *gluteus medius* muscle using a percutaneous skeletal muscle biopsy needle (Popper 14G) after intradermal analgesia with 0.5 mL of 2% lidocaine, according to Rivero (22). The muscle samples were arranged in tragacanth gum and immediately frozen in isopentane pre-cooled in liquid nitrogen to approximately -160°C (23). The samples were stored in liquid N₂ (-196°C) until used.

The frozen samples were thawed to -24°C and sectioned transversally in a cryostat at a thickness of 9 µm. The first serial cross-sections of the samples were used for enzyme-histochemical analysis and were placed on glass coverslips. The subsequent sections were used for immunohistochemical analyses and were placed on glass slides. The glass coverslips and slides were treated with 3-aminopropyl-trietoxisilane prior to use. Further sections were stored in

Eppendorf tubes for myosin extraction and electrophoretic analysis (5–12 sections per sample), and the rest of the samples were used to determine NOS activity. All of the sections were then stored at -70°C until further processing.

Myosin heavy chain (MHC) analysis and fiber typing

MHC expression was analysed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), according to Staron *et al.* (23). Five to twelve serial cross-sections were placed in 0.5 mL of lysing buffer containing 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, and 2.3% (w/v) SDS in 62.5 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane HCl buffer (pH 6.8) and heated for 10 min at 60°C. Small amounts of the extracts (3-5 µL) were loaded onto 7-10% gradient polyacrylamide running gels with 4% stacking gels and then run overnight at 120 V followed by staining with Coomassie blue (24). The MHC isoforms were identified according to their apparent molecular masses by comparison with those of marker proteins and also based on the migration patterns from single-fiber analysis. The levels of the MHC isoforms were quantified by densitometry using a Sharp scanner followed by digitalization of the images using Image Master 1D Elite software (Amersham Pharmacia).

Muscle fiber-type composition was determined by histochemistry for myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) (25) with pre-incubations at pH 4.35, 4.55 e 10.35.

NADH-diaphorase activity

The oxidative capacity of the different types of muscle fibers was analyzed by staining serial cross-sections for nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase (NADH-TR) according to Dubowitz and Brooke (26). Frozen sections of muscle samples were incubated at 37°C for 30 min in 0.2 M Tris buffer, pH 7.4, containing 0.8 mg of NADH/mL and 1.0 mg of nitroblue tetrazolium (NBT)/mL. The sections were then fixed for 5 min at 4°C with 5% (v/v) formaldehyde buffered at pH 7.0. Fixed sections were then rinsed several times with water and mounted on glass coverslips in Enttalan[®] resin (1.07961.0100; Merck, Germany).

nNOS immunohistochemistry

The sections were rinsed (3 times, 5 min each) with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and endogenous peroxidase was blocked using PBS containing 3% (v/v) hydrogen peroxide (3 washes, 3 min each). Subsequently, the primary polyclonal antibody raised against rabbit brain NOS (nNOS) (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) was diluted 1:10 in PBS (pH 7.4) containing 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and the sections then incubated overnight with this antibody in humid chamber at 37°C. Controls for immunostaining were done by replacing the primary antibody with PBS alone. After extensive washing (3 times, 5 min each) in PBS, the sections were incubated with EnVision[™] (K1491, DAKO) dextran polymer for 1 h at 37°C and then detected by diaminobenzidine (DAB) peroxidation in PBS containing 1% DMSO (v/v), 0.5% (v/v) hydrogen peroxide and 0.6% (w/v) DAB (27). Meyer's hematoxylin was used as background staining. After staining, the slices were dehydrated in a graded alcohol series, rinsed in xylol and covered with Enttalan[®] resin and a coverslip for microscopy.

nNOS activity

Equine skeletal muscle samples were sliced using a cryostat and then assayed for NOS activity, which was determined using citrulline assay according to Rees *et al.* (28) as modified by Modolo *et al.* (29). Muscle from sedentary and trained horses (10-20 mg) was homogenized with or without 1% Triton-X100 (v/v) in 500 μ L of cooled extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 320 mM sucrose, 10 μ g of leupeptin/mL, 10 μ g of soybean trypsin inhibitor/mL, 2 μ g of aprotinin/mL, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM dithiotreitol and 10 mM reduced glutathione). The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant from samples extracted with or without 1% Triton-X100 was used in the citrulline assay. Forty microliters of each supernatant were added to 100 μ L of assay buffer (40 mM HEPES, pH 7.2, containing 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 20 μ M L-citrulline, 22.5 μ M L-arginine, 50 mM L-valine, 10 μ M FAD, 10 μ M FMN, 1 mM dithiothreitol, 50 μ M 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, 3.5 μ g of calmodulin/mL, 0.1 mM β -NADPH and 0.5 μ Ci of L-[U-¹⁴C]arginine/mL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). After incubation for 30 min at room temperature, the reaction was stopped by adding 1 mL of Dowex[®]-Ag 50W (200-400 mesh, 8% charged with Na⁺) suspended in 100 mM HEPES containing 10 mM EDTA, pH 5.5 (1:1.5, v/v). The resin was removed by centrifugation (10,000 g, 10 min at 18 °C) and 400 microliters of the resulting supernatant was added to 3 mL of scintillation liquid and counted in a Beckman LS 6000 counter. NOS activity was determined as the difference between the total L-[U-¹⁴C] citrulline produced in complete medium reaction and that produced in medium contained 3 mM L-NAME. The dependence on Ca²⁺ was checked using medium containing 2 mM EGTA. Protein

concentrations were determined by the Coomassie blue-dye-binding method (30) using Bio-Rad protein reagent and BSA as standard.

Data analysis

All of the data were analyzed using Student's t-test and ANOVA followed by the Tukey test. The Kruskal-Wallis test was also used because for a small number of samples preliminary analysis indicated that a nonparametric test and use of the median rather the average data were more suitable for comparisons between the two groups of horses.

Results

Myosin heavy chain (MHC) composition

Myosin heavy chain analysis of *gluteus medius* muscle samples from nine sedentary and nine endurance-trained horses identified the three *MHC* isoforms known to be expressed in horse skeletal muscle (17). These *MHC* isoforms were clearly separated by their electrophoretic mobilities (Fig. 1). *MHC I* was the fastest migrating (lower band), *MHC IIx* showed intermediates migration (middle band) and *MHC IIa* was the slowest migration band (upper band). Horses in the SH group showed considerable phenotypic variation in their expression of myosin. Some horses of the sedentary group (SH) had a myosin isoform profile similar to that of trained horses (TH).

The *MHC* content of each sample was quantified by densitometry, and the mean values for the relative percentages of *MHCs* of the two groups were estimated. Despite the variation in *MHC* content among individuals, a change in the distribution of myofibers between sedentary and endurance-trained horses was noticeable (Figure 2). Trained horses had a significant higher ($P = 0.047$) relative percentage of *MHC IIa* (56.5% versus 46.0% in the SH group) and, consequently, a lower content ($P = 0.031$) of *MHC IIx* (15.0% versus 29.4% in the SH group). Trained horses also had a higher relative percentage of *MHC I* (28.7%) when compared with that of SH horses (24.4%), although this difference was not significant.

Fiber-type distribution

Figure 3A-C shows the mATPase histochemical reaction for a muscle sample from one individual of the sedentary group. Type I fibers were identified by their high mATPase activity after pre-incubation at acidic pH (Fig. 3A and B) and their low mATPase activity at basic pH (Fig. 3C). On the other hand, type II fibers were identified by their low mATPase activity at pH 4.35 and high mATPase activity at pH 10.35. The sub types of pure type II fibers could be distinguished by their different mATPase activities at pH of 4.55, with IIX fibers showing moderate activity whereas IIA fibers had low activity, compared with that of type I fibers. Also, at this pH, a hybrid fiber type could be distinguished by the intensity of its mATPase activity, which was intermediate to that of IIA and IIX. The predominant *MHC* isoforms expressed in this hybrid fiber were not quantified and were designated as type IIAX. Thus, the histochemical analysis of mATPase allowed the identification of three groups of pure fiber types consisting of slow-oxidative (type I), fast-oxidative (type IIA) and fast-glycolytic (type IIX) myofibers and

also a hybrid oxidative-glycolytic (type IIAX) fiber. Hybrid type C fibers were not detected by the mATPase technique, probably because they normally account for only a small proportion (1–2%) of fibers in skeletal equine muscle (20) and can be detected only by immunohistochemistry (31).

The mean relative content of the *MHC*-based fiber types in each group of horses is shown in Fig. 2. The *gluteus medius* skeletal muscle of sedentary horses, at 5 cm depth, consisted predominantly of pure fast-oxidative (IIA, 39.3%) and fast-glycolytic (IIX, 31.4%) fibers and a considerable population of slow-oxidative (I, 25.1%) fibers. The hybrid type IIAX corresponded to 4.1% of the total population. The muscles of trained horses (TH) had a significantly higher ($P = 0.015$) mean relative percentage of fast-oxidative (52.6%) and a significantly lower ($P = 0.012$) content of fast-glycolytic (12.8%) fibers when compared to the muscles of sedentary horses (39.3% and 31.4%, respectively). The TH group also had higher mean relative percentages of slow-oxidative (29.1%) and hybrid type IIAX (5.3%) fibers when compared with those of sedentary animals (25.1% and 4.1%, respectively), but these differences were not significant. Thus the differences in fiber type composition between the *gluteus medius* muscle of sedentary and trained horses correlated well with the changes in the relative *MHC* content. These findings agree with endurance exercise studies that have shown alterations primarily within the fast fiber population, with a shift from fast-glycolytic to fast-oxidative fibers (15).

NADH dehydrogenase activity

By using serial cross-sections, it was possible to combine myosin heavy chain-based fiber typing with NADH dehydrogenase histochemistry in order to characterize the metabolic state of

each fiber type. As shown in Figure 3D, in sedentary horses, slow-oxidative type I fibers had high NADH dehydrogenase activity while fast-glycolytic type IIX fibers showed only low NADH activities, as indicated by the intensity of the reaction. Fast-oxidative type IIA and hybrid fibers type IIAX showed intermediate levels of NADH activity. Thus, the decreasing oxidative capacity ($I > IIA > IIAX > IIX$) was directly correlated to muscle fiber typing based on mATPase activity (Fig. 3A-C) in sedentary horses. NADH diaphorase staining was stronger in all fiber types of the TH horses, but was best visualized in type II fibers in which the NADH diaphorase reactivity was more intense (Fig. 3E-F) when compared with that of samples from the SH group (Fig. 3D). These results suggested that the muscle of TH horses had a higher oxidative capacity, a conclusion consistent with well-known oxidative adaptations to exercises training (15,16,18,19).

nNOS immunolocalization

Immunohistochemistry showed that all muscle samples from trained and sedentary horses were positively labeled for nNOS when a polyclonal antibody raised against mouse nNOS was used. nNOS immunostaining was stronger in muscle samples from the TH group (Fig. 4A) compared to the SH samples (Fig. 4B). nNOS labeling in samples from sedentary horses was faint and restricted to the subsarcolemmal compartment. In contrast, nNOS immunostaining in muscle samples from trained horses was stronger and distributed throughout the fiber surface, including the periphery. No reaction was seen in the negative control in which buffer replaced the primary antibody (Fig. 4C). In these samples, the cell nuclei stained with hematoxylin could be seen. Figure 4D shows the same visual field as Figure 4C but, in this case the cells were labeled with the nNOS primary antibody.

Figure 4 also shows that nNOS labeling was heterogeneously distributed on the muscle tissue surface, suggesting a differential expression according with the type of muscle fiber. Indeed, by combining the immunohistochemical reaction to nNOS with the mATPase and NADH diaphorase histochemical activities using serial cross-sections, it was possible to correlate nNOS expression with muscle fiber typing. Figure 4A shows an nNOS labeled section of muscle sample from a sedentary horse that, in a subsequent serial section, was stained for mATPase activity (Fig. 3A-D). As can be seen, nNOS staining occurred mainly in the subsarcolemmal area of fast-oxidative type IIA and hybrid type IIX fibers. Fast glycolytic type IIX and slow-oxidative type I fibers were not stained and, as a result, it was possible to observe differential hematoxylin staining between these two types of fibers in which the strong blue staining of I fibers contrasted with the faint reaction for type IIX fibers.

Figure 4A and D also show that the strongest nNOS-stained fibers seen in the TH group were labeled both cytoplasmically and peripherally, and corresponded to fast oxidative type IIA fibers. Type IIX fibers of the TH group were also labeled for nNOS, in contrast to sedentary horses. In these fibers, nNOS immunostaining was detected mostly in the cytoplasm. There are no nNOS labeling in the slow-oxidative type I fibers of the TH group, as was also the case for sedentary horses. Overall, these results show that the level and subcellular localization of nNOS expression in the *gluteus medius* muscle of horses changes with the fiber type and endurance training.

nNOS activity

NOS activity was detected in the soluble fraction of muscle lysates and there was no significant difference between the SH (44.5 ± 2.1 pmol L-[U- ^{14}C]citrulline/h/mg, n=9) and TH (42.8 ± 1.2 pmol L-[U- ^{14}C] citrulline/h/mg, n=9) groups. Also, the NOS activities in the soluble fraction were mainly Ca^{2+} -dependent (36.1 ± 3.7 and 35.7 ± 3.8 pmol L-[U- ^{14}C] citrulline/h/mg) for samples from the SH and TH groups, respectively, as measured by the decrease in L-citrulline production in the presence of EGTA (Fig. 5A). In contrast, NOS activity in particulate fractions extracted with 1% Triton X-100 was greater in trained animals. A three-fold higher NOS activity (163.7 ± 36.1 pmol L-[U- ^{14}C]citrulline/h/mg) was detected in samples of the TH group when compared with that of the SH group (55.1 ± 10.0 pmol L-[U- ^{14}C]citrulline/h/mg). NOS activity in the particulate fraction was partially Ca^{2+} -dependent (70 ± 38.8 and 36.7 ± 5.7 pmol L-[U- ^{14}C]citrulline/h/mg) in samples from the TH and SH groups, respectively (Fig. 5B).

Discussion

To our knowledge, this is the first demonstration of nNOS expression in equine skeletal muscle and shows that this NOS isoform can be detected using a polyclonal antibody raised against rabbit brain NOS. In the *gluteus medius* muscle of sedentary horses, nNOS was expressed predominantly at subsarcolemmal sites, as in other mammals (13,14). This finding suggested that this isoform corresponded to the nNOS μ alternative splicing variant that is a component of the dystrophin glycoprotein complex that is associated with the sarcolemma of skeletal muscle fibers (3). Muscle of endurance-trained horses had higher levels of nNOS expression when compared to muscle from the sedentary horses. In accordance with these results

the NOS activity of the particulate fraction in samples of the TH group was significantly higher when compared with that of the SH group. In addition, especially in endurance-trained horses, nNOS was also found at cytoplasmic sites, suggesting that it may correspond to at least one of two known cytoplasmic nNOS β and nNOS γ alternative splicing variants of nNOS (3,6). However, NOS activity in the soluble fraction of the TH group was not significantly different from that of the SH group. A possibility that could explain this finding would be an increase in the expression of the alternatively spliced membrane-bound isoform nNOS α or nNOSmit located in mitochondria (32). This suggestion agrees with the aerobic-oxidative adaptation induced by endurance training seen here and described in other studies [15,16,18,19]. Thus, the higher Ca²⁺-dependent NOS activity found in the particulate fraction of muscle lysates from endurance-trained horses may reflect a higher expression of alternative splicings of nNOS μ and/or nNOSmit.

Higher levels of nNOS expression in endurance-trained animals have also been observed in the *gastrocnemius* and *diaphragm* muscles of rats (21). In contrast, no significant changes were observed in the expression of nNOS in the *vastus lateralis* muscle of human athletes after a six-week endurance running protocol (12). This discrepancy may reflect metabolic differences between the species used or, alternatively, could be the result of a training protocol that was insufficient to change the profile of muscle fiber types in human athletes.

All of horses in the TH group had been trained for long periods and had some years of experience in competition. The increased nNOS expression in this group probably represented an induced muscular adaptation to endurance training. Indeed, the differences between trained and sedentary horses, seen as variations in the expression profile of myosin isoforms and in the typology of muscular fibers agreed with previous studies in horses (19). The long distance-long

duration exercise at lower intensity increases the relative percentage of the slow-oxidative (type I) and fast-oxidative (type IIA) myofibers, while the fast-glycolytic (type IIX) fibers decreases (15,19).

Despite the distinct muscle typology of the two groups of horses, phenotypic variability among individuals of the same group was observed. This variability determines the muscle plasticity and can influence the response to resistance training (20). Individuals, breeding lines or races of horses with a higher relative content of oxidative fibers (types I and IIA) and, consequently, a lower proportion of glycolytic fibers (type IIX) can be considered genetically more adapted to endurance (20). Consequently, muscle typology could be an important diagnostic tool in assessing individual athletic ability (22).

Another interesting observation in this study was the heterogeneous distribution of nNOS among the different myofibers of the *gluteus medius* muscle. In contrast to humans, and similarly to rodents, nNOS expression in equine skeletal muscle was enriched in fast-twitch type II fibers (IIA and IIX) and absent in slow-twitch type I fibers (2). Furthermore, nNOS expression was higher in fast-oxidative type IIA than in fast-glycolytic type IIX fibers, as is the case for rat skeletal muscle (13). This differential expression of nNOS suggests an important regulatory effect of nitric oxide in the energy metabolism of muscles. The correlation between nNOS expression in equine skeletal muscle and the corresponding muscle typology indicates a greater expression of this enzyme in mixed fibers, such as type IIA that are oxidative and glycolytic. In addition, the low or absent expression of nNOS in oxidative type I muscle fibers, especially in endurance trained animals, probably favors the aerobic metabolism.

In conclusion, nNOS is differently expressed and localized in the *gluteus medius* muscle of endurance-trained compared to sedentary horses. The greater expression of nNOS in the

muscle fibers of trained horses suggests a biochemical adaptation induced by endurance training, and may have implications in the performance of athletic horses.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). F.J.G.P is the recipient of a studentship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank Dr. Marcelo Alvarenga for his assistance in the nNOS immunolabeling. We are also grateful to Dr. Gerson E. R. Campos for his assistance in the experiments of muscle typing.

References

1. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258:1853-2008.
2. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2001;81:209-237.
3. Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *J Cell Sci* 2003;116:9-15.
4. Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1849-1857.
5. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? *J Clin Invest* 1997;100-9:2146-2152.
6. Mungrue N, Bredt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 2003;179:123-135.
7. Wang MX, Murrell DF, Szabo C, Warren RF, Sarris M, Murrell GAC, Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide* 2001;5:219-232.
8. Mohr S, Stamler JS, Brune B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J Biol Chem* 1996;271:4209-4214.

9. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-USmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome C oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Lett* 1994;345:50-54.
10. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994;372:546-548.
11. Hussain SN, El-Dwairi Q, Abdul-Hussain MN, Sakkal D. Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. *J Appl Physiol* 1997; 83:348-353.
12. Frandsen U, Hoffner L, Betak A, Saltin B, Bangsbo J, Hellsten Y. Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000;89:1033-1038.
13. Planitzer G, Miethke A, Baum O. Nitric oxide synthase-1 is enriched in fast-twitch oxidative myofibers. *Cell Tissue Res* 2001;306:325-333.
14. Grozdanovic Z. NO message from muscle. *Microsc Res Tech* 2001;55:148-153.
15. Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 2001;115:359-372.
16. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity - from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;146:159-216.
17. Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. A sensitive electrophoretic method for the quantification of myosin heavy chain isoforms in horse skeletal muscle: histochemical and immunocytochemical verifications. *Electrophoresis* 1997;18:1967-1972.
18. Schiaffino S, Gorza L, Ausoni S, Bottinelli R, Reggiani C, Larson L, Edström L, Gundersen K, Lömo T. Muscle fiber types expressing different myosin heavy chain

- isoforms. Their functional properties and adaptative capacity. In: Pette D, ed. *The Dynamic State of Muscle Fibers*. Berlin: de Gruyter, 1990:329-341.
19. Serrano AL, Quiroz-Rothe E, Rivero JLL. Early and long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Pflug. Arch. Eur. J Physiol* 2000;441:263-274.
 20. Rivero JLL, Serrano AL, Henckel P, Aguera E. Muscle fiber type composition and fiber size in successfully and unsuccessfully endurance-raced horses. *J Appl Physiol* 1993;161:1758-1766.
 21. Vassilakopoulos T, Deckman G, Kebbewar M, Rallis G, Harfouche R, Hussain SNA. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L452-L457.
 22. Rivero JLL. Muscle biopsy as a tool for assessing muscular adaptation to training in horses. *Am J Vet Res* 1996;57:1412-1416.
 23. Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GER. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 1999;111:117-123.
 24. Bär A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscles. *FEBS Lett* 1988;235:153-155.
 25. Staron RS, Pette D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fiber types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 1993;100:149-153.
 26. Dubowitz V, Brooke MH. *Muscle biopsy: a modern approach*, Saunders, London, 1973.
 27. Farr AG, Nakane PK. Immunohistochemistry with enzyme labelled antibodies – A brief review. *J Immunol Meth* 1981;47:129-144.

28. Rees DD, Cunha FQ, Assreuy J, Herman AG, Moncada S. Sequential induction of nitric-oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. Br J Pharmacol 1995;114:689-693.
29. Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. Plant Physiol 2002;130:1288-1297.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
31. Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: an immunohistochemical and electrophoretic study. Anat Rec 1996;246A:185-194.
32. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. J Biol Chem 2002;277:38079-38086.

Figure legends

Figure 1. Gel electrophoresis of left *gluteus medius* muscle biopsies of nine sedentary (SH) and nine endurance-trained (TH) horses. The biopsies were obtained at a depth of 5 cm. The myosin heavy chain (MHC) isoforms are identified as type I (MHC I), type IIa (MHC IIa) and type IIx (MHC IIx).

Figure 2. Myosin heavy chain (MHC) composition and fiber type distribution in the left *gluteus medius* muscle of sedentary (SH) and endurance-trained (TH) horses. Myosin heavy chain isoform types I (MHC I), IIA (MHC IIa) and IIX (MHC IIx) were separated by SDS-PAGE and then quantified by densitometry. The relative contribution of each fiber type was expressed as the mean percentage $\pm$ SE of nine horses in each group. Pure slow-oxidative (type I), fast-oxidative (type IIA) and fast-glycolytic (type IIX) fibers and hybrid oxidative-glycolytic (type IIX) fibers were identified by mATPase histochemistry and their levels expressed as the mean percentages $\pm$ SE for 50 fibers from each of nine horses in each group. * $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis test).

Figure 3. Serial cross-sections of *gluteus medius* muscle samples from sedentary and trained horses stained for mATPase and NADH dehydrogenase activities. A to D, Myosin ATPase activity, after pre-incubation at pH 4.35 (A), 4.55 (B) and 10.35 (C) and NADH-diaphorase activity (D), all from a sedentary horse. E, mATPase activity at pH 4.55 and F, NADH-diaphorase activity in muscle from a trained horse. Pure slow-oxidative (type I), fast-

oxidative (type IIA) and fast-glycolytic (type IIX) fibers and hybrid oxidative-glycolytic (type IIAX) fibers are indicated. Original magnification, 200 X.

Figure 4. Immunostaining for nNOS in *gluteus medius* muscle of sedentary and trained horses. Positive nNOS labeling in a trained (A) and sedentary (B) horse. C and D are serial cross-section of a muscle from a trained horse. In C the primary nNOS antibody was replaced by PBS buffer, compared to the positive reaction for nNOS (D). Fiber type identification was based on mATPase and NADH-diaphorase histochemical reactions. Panel B is an amplification of a serial section subsequent to the sections shown in fig. 3A-D. Original magnification, 400 X.

Figure 5. NOS activity in muscle samples from sedentary (SH) and trained (TH) horses. The tissue was homogenized without (A) or with (B) Triton X-100 in medium containing all NOS cofactors, and the supernatants were analyzed for NOS activity. The results were expressed as the difference between L-[U ¹⁴C] citrulline formation in complete reaction medium and that in the presence of 3 mM L-NAME (L-NAME sensitive) or 2 mM EGTA (Ca²⁺ dependent). Each bar represents the mean $\pm$ SE of two experiments each done in triplicate. * $P < 0.05$ (Student's *t* test).

Figure 1

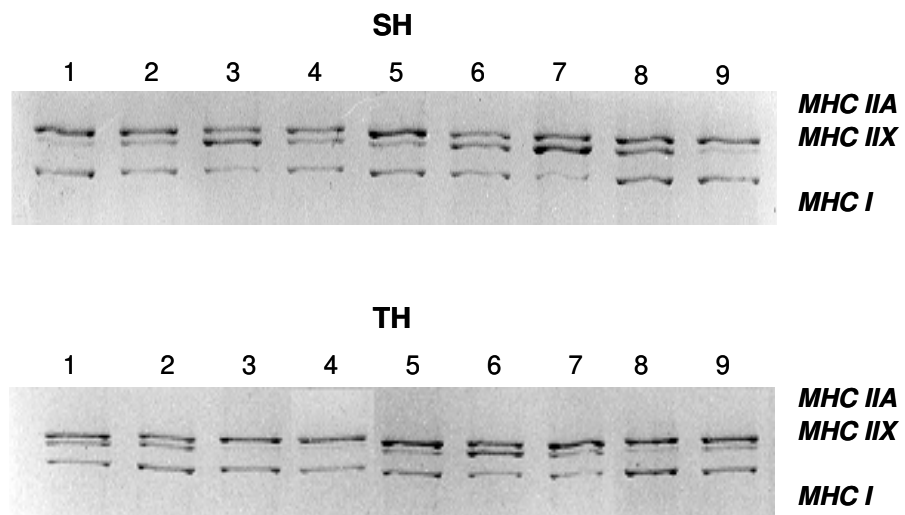


Figure 2

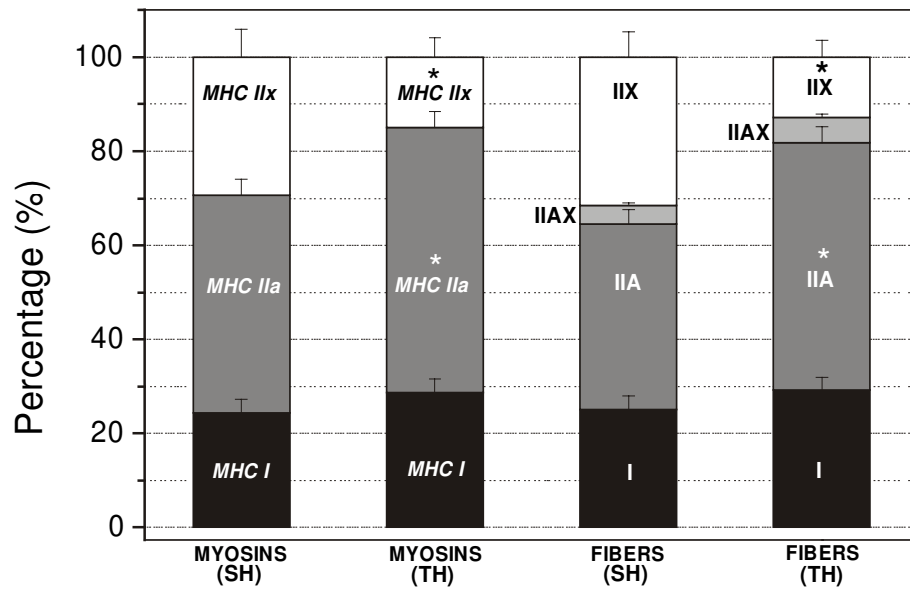


Figure 3

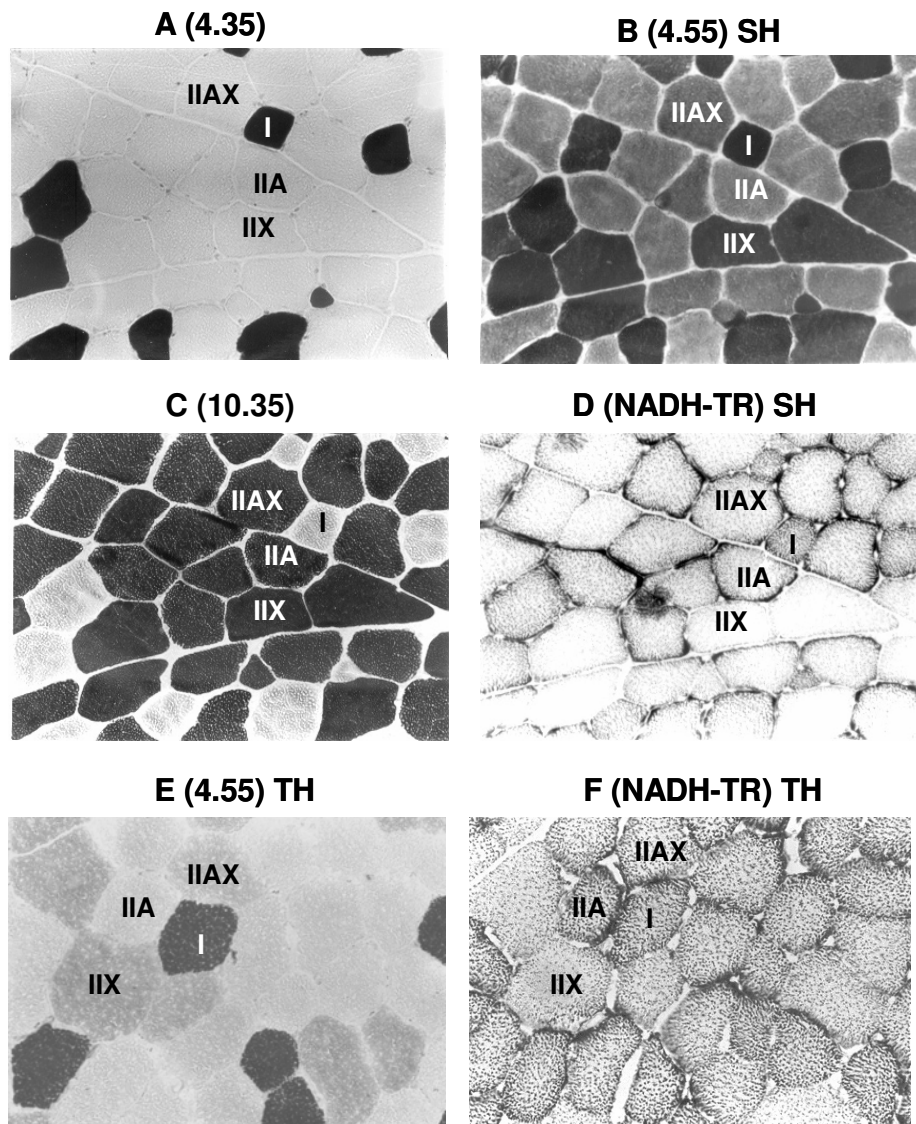


Figure 4

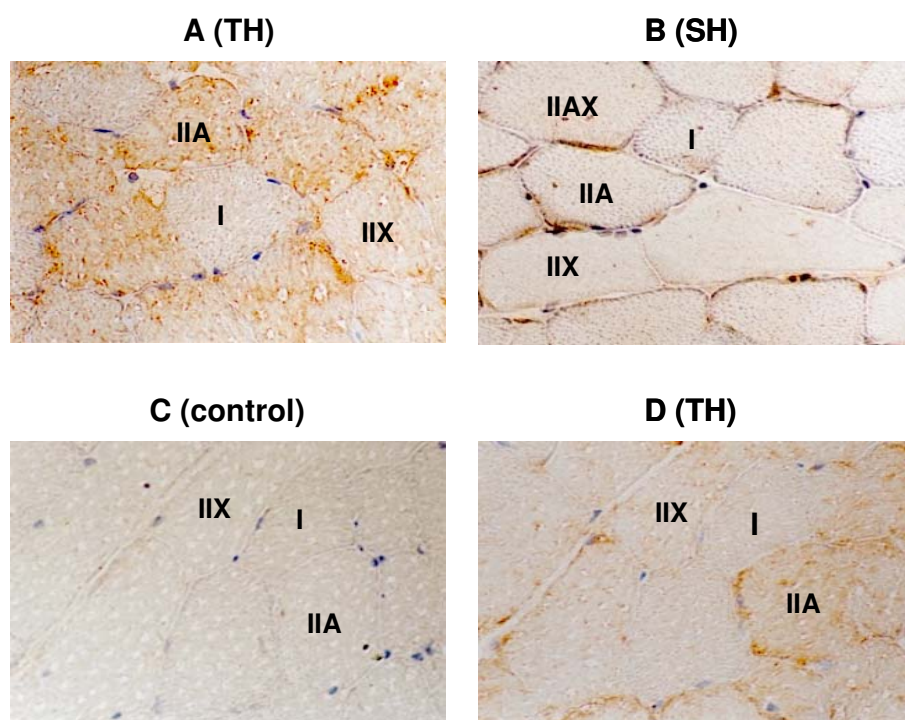


Figure 5

