

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



VALÉRIA AUGUSTO

**ANÁLISE DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES DE
CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL/6J**

6689 DE 005

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

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

Orientador: Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE UL
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Au45a
V EX
TOMAR 52536
PROC 16-129/03
C D X
PREÇO R\$11,00
DATA 13/03/03
Nº CPD _____

2

CM00180496-9

16 ID 284909

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

Au45a

Augusto, Valéria

Análise dos tipos de fibras musculares de camundongos da
linhagem C57BL6J/Valéria Augusto. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

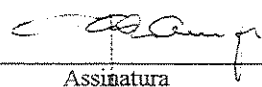
Orientador: Gerson Eduardo Rocha Campos
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Tipos de fibras musculares. 2. Camundongos C57BL6J. I. Campos,
Gerson Eduardo Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

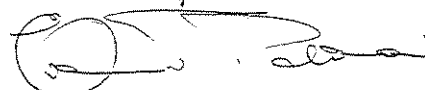
Data da Defesa: 26/08/2002

BANCA EXAMINADORA

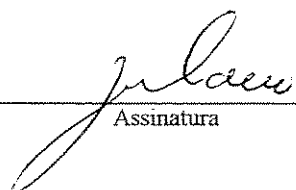
Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari


Assinatura

Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo


Assinatura

Profa.Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete


Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais. Tamanha dedicação de toda uma vida para o estudo e formação dos filhos, merecem também grande parte do mérito deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de crescer espiritual e profissionalmente e pelas pessoas que colocou em meu caminho afim de concretizar mais esta conquista.

Aos meus pais pela dedicação e amor incondicionais e sem limites. Com seu exemplo de vida lançaram-me com muita confiança em busca de meus objetivos, sendo este trabalho uma das metas mais importantes de minha vida. Mais um sonho alcançado.

Ao meu irmão Pedro, pela compreensão nos diversos finais de semana de ausência, além de constantes incentivos ao meu aprimoramento pessoal e profissional. Conduziu-me muitas vezes pelas mãos em várias fases de minha caminhada enquanto estudante. Devo muito de meus conhecimentos sobre a vida e ciência à meu irmão. Obrigada.

À minha irmã Marinei também agradeço pelos conselhos recebidos como de uma segunda mãe em minha primeira infância e adolescência. Guardo todos eles comigo, principalmente nos momentos de conflito, pois sempre enfrentou com muita força e determinação todos os seus obstáculos. Muito obrigada pelo belo exemplo de perseverança e personalidade.

À minha irmã Marina pelas constantes visitas e incansáveis estímulos ao meu crescimento profissional. Como minha irmã mais velha observo todas as suas atitudes também como exemplo de vida.

Ao Thiago pelo companheirismo em todos os momentos difíceis, principalmente naqueles em que pensei desistir de tudo. Durante os maiores conflitos que enfrentei, especialmente no período final deste trabalho, foi quem mais próximo estive me ajudando a solucioná-los e a controlar toda minha grande ansiedade. Obrigada por me ensinar a ver os problemas sem complicações desnecessárias e com praticidade.

À minha grande amiga Cibele, presente durante todo o período deste estudo acadêmico. Vivenciamos juntas muitos momentos tristes e alegres, sendo imprescindíveis ao grande aprendizado pessoal e profissional que adquirimos durante nossa permanência na Unicamp. Adquiri com nossa convivência o precioso valor de uma amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos, pela oportunidade de realizar este estudo e ingressar na pesquisa científica seguindo a linha da plasticidade muscular. Sinto que aprendi apenas como buscar mais conhecimentos acerca deste tema, que me fascinou desde o início. Tenho certeza de que muitos conhecimentos nas áreas da saúde e esporte poderão ser originados desta linha de pesquisa. Obrigada pela credibilidade.

Aos examinadores Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari e Profa. Dra. Valéria H. A. Cagnon Quitete pela orientação deste trabalho.

Dedico agradecimentos especiais aos professores do Departamento de Anatomia e Biologia Celular Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari, Profa. Dra. Valéria H. A. Cagnon Quitete, Prof. Dr. José Meciano Filho, Prof. Dr. Humberto Santo Neto, Prof. Dr. José Angelo Camilli e Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pelas inúmeras lições durante todo curso.

Às secretárias da Pós Graduação do Departamento de Biologia Celular e Estrutural Lílham Alves Senne Panagio e Sílvia Helena Burgui Kalaf, pela paciência na orientação em todas as questões burocráticas. Obrigada pela dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia-Unicamp Norivaldo Celestino e Marcos Aurélio Ribeiro de Paula, pela assistência nos procedimentos Laboratoriais, Sra. Marlene Lima pelos cuidados dispensados aos animais utilizados neste estudo, Ana Floriana Rodrigues, Carlos Roberto Gonçalves, Delta Rodrigues da Silva,

Lourdes Pinheiro, Odete de Camargo Fabiano, Paulo Afonso Bernardes e Paulo Francisco da Silva, pela atenção e respeito durante todo período em que estive no departamento.

À todos os Amigos Espirituais que muito ajudaram na concretização deste sonho e de vários outros que nos fazem evoluir.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante parte deste estudo.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta conquista.

ÍNDICE

Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Aspectos Gerais sobre Identificação de Fibras Musculares.....	15
3. Justificativa e Objetivo do Trabalho.....	20
4. Trabalho submetido ao Periódico Histochemistry and Cell Biology.....	23
5. Considerações Finais.....	44
6. Referências Bibliográficas.....	48
7. Anexos.....	55
8. Lista de Abreviações.....	60

RESUMO

Os músculos dos camundongos da linhagem C57BL6J são pouco conhecidos, principalmente no que diz respeito às fibras híbridas. Assim sendo, procurou-se, no presente trabalho, delinear a composição do músculo sóleo (SOL), extensor longo dos dedos (EDL), tibial anterior (TA) e gastrocnêmio (GAS) desses animais em camundongos da linhagem C57BL6J. Utilizou-se a técnica histoquímica da mATPase para determinação dos tipos de fibras musculares em conjunto com a técnica bioquímica de eletroforese para identificação das isoformas de miosina. O músculo SOL apresentou fibras do tipo I (38.42%), IIA (37.90%), IIAD (18.72%) e IID (4.94%). No EDL observou-se fibras do tipo I (0.67%), IC/IIC (2.98%), IIA (0.64%), IIAD (8.03%), IID (1.07%), IIDB (24.83%) e IIB (61.74%). O TA mostrou predominância de fibras dos tipos IIB (58.54%) e IIDB (31.26%), seguido de fibras dos tipos IIAD (4.86%), IID (2.44%), IIA (1.71%), I (0.71%) e IC/IIC (0.46%). No GAS foram delineadas fibras dos tipos IIB (55.08%), IIDB (18.41%), IID (2.78%), IIAD (12.36%), IIA (5.56%), IC/IIC (0.05%) e I (5.74%). Concluiu-se neste trabalho que o músculo SOL de camundongos da linhagem C57BL6J apresenta predominância de fibras dos tipos I e IIA, devido à sua função de músculo postural. Nos músculos, EDL, TA e GAS, a maioria de fibras são do tipo IIB. A possível explicação para a maior ocorrência de fibras IIB, de contração rápida no EDL TA e GAS, deve-se ao reduzido tamanho desses animais, o que permite, e em algumas situações exige, movimentos rápidos. Por isso há predominância de fibras de contração rápida nestes músculos.

Abstract

The muscles of C57BL6J mice are little known, especially with respect to hybrid fibers. Thus, in the present study we present the composition of the (SOL), extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (GAS) muscles of these animals. The mATPase histochemical analysis was used for typing muscle fibers, and the biochemical electrophoresis technique for myosin heavy chain isoforms identification. The SOL muscles presented fibers of types I (38.42%), IIA (37.9%), IIAD (18.72%) and IID (4.95%) and the EDL presented fibers of types I (0.59%), IC/IIC (2.63%), IIA (0.57%), IIAD (7.09%), IID (0.96%), IIDB (21.92%), and IIB (66.23%). The TA muscle showed a predominance of fibers of types IIB (58.54%) and IIDB (31.26%), followed by fibers of types IIAD (4.86%), IID (2.44%), IIA (1.71%), I (0.71%), and IC/IIC (0.46%). The GAS muscle showed fibers of types IIB (55.08%), IIDB (18.41%), IID (2.78%), IIAD (12.36%), IIA (5.56%), IC/IIC (0.05%), and I (5.74%). Nevertheless, in the present study we conclude that the SOL muscle of C57BL6J mice had predomination of I e IIA type fibers. In EDL, TA and GAS muscle, the great number of fiber are classified as type IIB. The explanation for major type IIB fast fiber in EDL, TA and GAS muscle, is the little size of mice, that have fast movements.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A proteína mais abundante dos músculos estriados esqueléticos é a miosina, possuidora de cadeias leves e pesadas e representando, aproximadamente 25% do total de proteínas. Sua principal função é a sustentação dos sarcômeros e a participação como proteína reguladora no processo de contração muscular, interagindo com a actina e com a molécula de ATP. Esta interação difere em velocidade para cada tipo de isoforma de miosina, determinando assim a velocidade de contração do músculo (Baldwin and Haddad 2001).

Nos trabalhos pesquisados, foram identificadas nove isoformas de miosina nos músculos estriados esqueléticos e cardíacos de mamíferos: a) embriônica, b) neonatal, c) cardíaca alfa (α), d) cardíaca beta (β) ou lenta tipo I, e) rápida IIa, f) rápida IIc, g) rápida IIb, h) extraocular e i) mandibular ou mastigatória. A isoforma embriônica e a neonatal são encontradas, predominantemente, em músculos em desenvolvimento, mas podem ser encontradas em fibras adultas em situação de regeneração. A isoforma α e a β estão presentes, principalmente, nos músculos cardíacos, entretanto a isoforma α pode ser encontrada em certos músculos de animais adultos como o masseter. As isoformas β também podem ser encontradas em músculos esqueléticos em fase embrionária, e são as principais isoformas encontradas nas fibras de contração lenta. Nos músculos esqueléticos de indivíduos adultos foram identificadas as isoformas IIa, IIc/x e IIb. No músculo masseter dos carnívoros as principais isoformas presentes são a mandibular e a mastigatória e nos músculos extraoculares a isoforma predominante recebe o nome de extraocular. Estas são isoformas especializadas para o tipo de contração destes músculos. A isoforma extraocular está presente unicamente nos músculos extraoculares e nos músculos da laringe

e a isoforma mastigatória nos músculos mandibulares de carnívoros (Baldwin and Haddad 2001, Pette and Staron 2000).

As fibras musculares de ratos adultos apresentam, em geral, uma isoforma do tipo lenta (MHC slow) e três isoformas do tipo rápida (MHC fast) (Schiaffino and Reggiani, 1994). A forma lenta é chamada MHCI e as rápidas são chamadas, respectivamente, MHCIIa, MHCIIc e MHCIIb. A MHCIIc é também chamada de MHCIIx (Schiaffino et al. 1989; De Nardi et al. 1993). Estudos de fibras musculares isoladas (Single Fiber Analysis) vêm demonstrando uma correlação entre fibras classificadas através da técnica histoquímica da mATPase e as cadeias de miosina determinadas por eletroforese em coelhos (Staron and Pette 1986), ratos (Termin et al. 1989) e humanos (Staron 1991). Assim, fibras classificadas como sendo do tipo I apresentam a isoforma do tipo I (MHCI) e as dos tipos IIA, IIC e IIB, apresentam cadeias dos tipos IIA, IIC e IIB (MHCIIa, MHCIIc e MHCIIb). A maior parte das fibras musculares apresenta apenas um tipo de cadeia pesada de miosina (MHC) e são chamadas de fibras puras (Staron and Pette 1993). Entretanto, a análise de fibras musculares isoladas tem demonstrado que em algumas delas aparecem duas isoformas, tais como: MHCI+MHCIIa, MHCIIa+MHCIIc ou MHCIIc+MHCIIb (Staron and Pette 1993). Estas fibras são chamadas de híbridas. Aquelas que contém MHCI e MHCIIa são classificadas como sendo do tipo IC (predominância de MHCI) ou do tipo IIC (predominância de MHCIIa). As que contém MHCIIa e MHCIIc são do tipo IIAD ou IIDA e aquelas contendo MHCIIc e MHCIIb são do tipo IIDB ou IIBD (Staron and Pette 1993). Os diferentes tipos de fibras sugerem a existência de uma sequência contínua (“continuum”) das mais lentas até as mais rápidas, com as híbridas formando um intercâmbio (“gap”) entre os tipos de fibras puras, obedecendo sempre a sequência : **I↔IC↔IIC↔IIA↔IIAD↔IIDA↔IID↔IIDB↔IIBD↔IIB** (Staron et al. 1999). Embora

as fibras híbridas não representem porcentagem muito alta em relação às puras, dados indicam um considerável número dessas fibras em músculos de animais adultos (Biral et al. 1988, Staron 1991, Galler et al. 1994). Em ratos adultos normais pelo menos 3% das fibras contém MHCIIa+MHCIId e 10% contém MHCIId+MHCI Ib (Staron and Pette 1993).

2. ASPECTOS GERAIS SOBRE IDENTIFICAÇÃO DE FIBRAS MUSCULARES

2. Aspectos Gerais sobre Identificação de Fibras Musculares

Vários métodos já foram propostos para a classificação das fibras musculares esqueléticas segundo propriedades morfológicas, histológicas e fisiológicas. Há relatos de estudos sobre a diversidade dos tipos de fibras musculares desde 1873, quando Ranvier distinguiu “músculos brancos” de “músculos vermelhos”. Atualmente, pode-se associar o reconhecimento histoquímico de uma fibra muscular através da análise bioquímica da isoforma de miosina presente consistindo numa metodologia precisa (Single Fiber Analysis) (Pette and Staron 1990).

A classificação das fibras utilizando-se reações histoquímicas fornece informações qualitativas sobre os tipos de fibras, como por exemplo a classificação das fibras de acordo com suas cores em diferentes reações, sendo utilizada para estudos da morfologia do músculo em condições normais ou patológicas (Pette and Staron 1990).

Uma reação bastante utilizada em histoquímica para análise de fibras musculares é a mATPase. A compreensão da atividade ATPásica foi possível graças às observações realizadas por Engel em 1962 quando identificou dois tipos de fibras (tipos I e II) e suas propriedades de contração. Com a evolução da técnica, observou-se que diferentes valores de pH das reações forneciam dados importantes para classificação das fibras musculares, permitindo a determinação das chamadas fibras híbridas. Este método de diferenciação foi denominado “ATPase-based classification” (Brooke and Kaiser 1970).

Bárány (1967) verificou que fibras de contração rápida hidrolizavam mais rapidamente a molécula de ATP do que as de contração lenta concluindo então que quanto mais escuras as fibras maior era sua velocidade de contração. Sendo assim, diferenciou

fibras de contração rápida das de contração lenta de acordo com a coloração que apresentavam (Lieber 1992).

Em outros estudos (Brooke and Kaiser 1970, Müntener 1979) foi observado que os valores de pH nas reações da mATPase variam entre as espécies, interferindo diretamente na identificação das fibras musculares. Segundo Brooke e Kaiser (1970), os pontos críticos para diferenciação de fibras musculares são o valor do pH da reação e a duração da pré-incubação. Esses valores são diferentes para cada espécie, e podem variar também entre linhagens de animais. Na literatura, encontra-se nas reações mATPase em camundongos C57BL6J, valores de pH 4.3, 4.6 e 10.3 (Parry and Wilkinson 1989); em humanos 4.3, 4.55 e 10.4 (Hostler et al 2001); em coelhos 4.3, 4.5 e 9.6 (Staron and Pette 1987) e em ratos Fisher 344 valores de 4.1, 4.4 e 9.8 (Staron et al 1999).

Observa-se que as fibras de contração rápida coram-se de marrom escuro em pH alcalino e o inverso acontece com fibras de contração lenta. Em pH ácido as fibras lentas coram-se de marrom escuro e as rápidas de marrom claro. Este mecanismo ainda não encontra-se claramente elucidado (Lieber 1992).

A classificação de fibras musculares pela mATPase (Sréter et al. 1966, Seidel 1967, Guth and Samaha 1969) pode ser comparada com a análise bioquímica de isoformas de miosina com o objetivo de confirmação de dados (Hostler et al 2001).

As enzimas relacionadas com o metabolismo aeróbico e anaeróbico também são utilizadas para classificação das fibras musculares. Na reação histoquímica de SDH o objetivo é a diferenciação de fibras musculares como oxidativas e glicolíticas, isto é, caracteriza-se as fibras quanto a capacidade oxidativa que elas tem de gerar ATP pela fosforilação oxidativa. Esta reação ocorre na mitocôndria, o que explica a alta concentração destas organelas nas fibras oxidativas. A atividade da enzima SDH foi detectada de acordo

com a quantidade de mitocôndrias coradas na região subsarcolemal e entre as miofibrilas. Assim sendo, fibras oxidativas apresentam grande concentração de coloração roxa escura enquanto as glicolíticas aparecerão roxas menos intensa (Eisenberg 1983).

Na ausência de oxigênio as fibras musculares lançam mão da via glicolítica anaeróbica para gerar ATP. A enzima α GP é uma das enzimas utilizadas para distinguir as fibras musculares de acordo com seu potencial glicolítico. Esta reação histoquímica é muito parecida com a de SDH, entretanto a enzima não está localizada dentro das mitocôndrias e sim no citoplasma, resultando portanto em uma reação de coloração mais homogênea (Lieber 1992).

Inicialmente, a classificação das fibras musculares em brancas e vermelhas era utilizada como sinônimo de fibras rápidas e lentas, respectivamente (Barnard et al. 1971, Peter et al. 1972, Armstrong and Phelps 1984). A partir daí foi proposta uma classificação das fibras em oxidativas lentas (slow oxidative-SO), oxidativas glicolíticas rápidas (fast oxidative glycolytic-FOG) e as glicolíticas rápidas (fast glycolytic-FG) (Lieber 1992).

Uma outra forma para se determinar e classificar as fibras musculares é através de reações imunohistoquímicas. Esta técnica visa a identificação de proteínas presentes na fibra muscular de acordo com a propriedade de reconhecimento de determinadas regiões da proteína pelo anticorpo utilizado, sendo este anticorpo produzido pelo próprio animal (Lieber 1992). Entretanto, um problema considerável na utilização desta técnica é a necessidade de utilização de anticorpos específicos para cada tipo de fibra e para cada espécie animal.

Dentre as técnicas utilizadas, a identificação das isoformas de miosina pela eletroforese quando associada à mATPase permite a obtenção de dados qualitativos e

quantitativos na classificação das fibras musculares. Esta técnica é muito utilizada como confirmação dos resultados qualitativos obtidos nas reações histoquímicas.

Essas isoformas além de serem analisadas nas fibras musculares esqueléticas, são também identificadas em fibras intrafusais de determinados músculos extraoculares (Wieczorek et al. 1985, Asmussen et al. 1993), laríngeos (Delgaudio et al. 1995, Lucas et al. 1995), mastigatórios (Rowlerson et al. 1981, Mascarello et al. 1982 e 1983, Shelton et al. 1988; Kirkeby 1996). A técnica eletroforética pode ser realizada inclusive isolando-se apenas uma fibra muscular, com a certeza de se determinar seu tipo (Single Fiber Analysis) (Staron and Pette 1986). A análise de fibra única representa uma técnica completa e detalhada do estudo das bases moleculares da diversidade das fibras musculares, com dados tanto microbioquímicos como microimunoquímicos (Pette and Staron 1990).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DO TRABALHO

3. Justificativa e Objetivo do Trabalho

Existem poucos estudos com o objetivo de delinear a constituição dos músculos de camundongos (Dribin and Simpson 1977, Faranbach et al. 1978, Parry and Parslow 1981, Zardini and Perry 1994, Campos et al. 1995) no que se refere à porcentagem e área das fibras (Hämäläinen and Pette 1993). O objetivo de alguns autores (Dribin and Simpson 1977, Parry and Parslow 1981, Webster and Bressler 1985, Redenbach et al. 1988, Parry and Wilkinson 1989, Parry and Zardini 1990, Zardini and Parry 1994, Campos et al. 1995) foi apenas a avaliação das técnicas de identificação das fibras musculares de acordo com seus tipos (puras) e subtipos (híbridas). Nesses trabalhos, outras reações histoquímicas, como o NAD, SDH ou anticorpos monoclonais, foram utilizadas na diferenciação das fibras. Assim, diferentes critérios foram utilizados para classificação tais como: fibras vermelhas, intermediárias, brancas, oxidativas, glicolíticas, fibras tipo I, IIA e IIB (Parry and Parslow 1981, Redenbach et al. 1988, Parry and Wilkinson 1989, Campos et al. 1995), foram utilizados.

Os camundongos da linhagem C57BL6J vêm sendo utilizados para estudos ligados à regeneração neuro-muscular (Campos et al 1995, Marques et al. 1996), sendo de grande importância o conhecimento da composição de seus músculos esqueléticos. Com estes estudos obtém-se diferentes interpretações dos resultados já obtidos em ambas linhas de pesquisa, e torna-se possível a elaboração de novos trabalhos.

O objetivo do presente trabalho foi a análise dos músculos esqueléticos dos camundongos da linhagem C57BL6J, principalmente no que concerne aos tipos híbridos de fibras musculares. Obtendo-se mais informações sobre os tipos e subtipos de fibras

musculares de animais normais, pode-se correlacionar estes dados com os de animais tratados sob diferentes situações em estudos futuros.

4. TRABALHO SUBMETIDO AO PERIÓDICO *HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY*

4. Trabalho submetido ao periódico *Histochemistry and Cell Biology*

MUSCLE FIBER TYPES IN C57BL6J MICE

G E R Campos - V Augusto

Department of Anatomy,

Institute of Biology,

State University of Campinas,

Cep 13083-970,

Campinas, SP, Brazil.

Tel. (55) 19 37886104

Fax (55) 19 32893124

E-mail:

Abstract The objective of the present study was to analyze the skeletal muscles of C57BL6J mice using histochemical and biochemical methods. In general, rat skeletal muscle can present up to four myosin heavy chains (MHCI, IIa, IId and IIb). Analysis of isolated muscle fibers has demonstrated that type I, IIA, IID and IIB fibers, called pure, present type I, IIa, IId, and Iib myosin chains, respectively. Fibers defined as hybrid present at least two myosin chains such as MHCI+MHCIIa, MHCIIa+MHCIId or MHCIId+MHCIIb. These fiber types are denoted IC, IIC, IIAD, IIDA, IIDB or IIBD. The muscles of C57BL6J mice are little known, especially with respect to hybrid fibers. Thus, in the present study we present the composition of the (SOL), extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (GAS) muscles of these animals. The SOL muscles presented fibers of types I (38.42%), IIA (37.9%), IIAD (18.72%) and IID (4.95%) and the EDL presented fibers of types I (0.59%), IC/IIC (2.63%), IIA (0.57%), IIAD (7.09%), IID (0.96%), IIDB (21.92%), and IIB (66.23%). The TA muscle showed a predominance of fibers of types IIB (58.54%) and IIDB (31.26%), followed by fibers of types IIAD (4.86%), IID (2.44%), IIA (1.71%), I (0.71%), and IC/IIC (0.46%). The GAS muscle showed fibers of types IIB (55.08%), IIDB (18.41%), IID (2.78%), IIAD (12.36%), IIA (5.56%), IC/IIC (0.05%), and I (5.74%).

Key Words: Muscle Fiber Types, Myosin Heavy Chain, C57BL6J Mice

Introduction

Few studies are available about the composition of skeletal muscle of C57BL6J mice (Dribin and Simpson 1977, Farnbach et al. 1978, Parry and Parslow 1981, Parry and Zardini 1990, Hämäläinen and Pette 1993, Zardini and Parry 1994), especially with respect to the types of hybrid fibers. Since this animal strain is used in studies concerning neuromuscular regeneration (Campos et al. 1995, Marques et al. 1996), it is of interest to analyze some of their muscles.

The muscles of the hindlimbs of adult rats present a slow heavy chain myosin (MHC slow) and three fast heavy chain myosin isoforms (MHC fast) (Schiaffino and Reggiani 1994). The slow isoform is called MHCI and the fast ones are called MHCIIa, IId and IIb, respectively. The IId isoform is also called IIX (Baldwin and Haddad 2001, Pette and Staron 2001). Single fiber analysis has demonstrated a correlation between fibers classified by the histochemical mTAPase technique and the myosin heavy chains determined by electrophoresis in rabbits (Staron and Pette 1986), humans (Staron 1991) and rats (Termin et al. 1989). Thus, fibers classified as type I present type I heavy chain myosin (MHCI) and fibers classified as types IIA, IID and IIB present chains of types IIa, IId and IIb. Most muscle fibers present only one myosin heavy chain isoform and are called pure fibers (Staron and Pette 1993). However, two heavy chains occur in some fibers, such as MHCI+MHCIIa, MHCIIa+MHCIIId or MHCIIId+MHCIIb (Staron and Pette 1993). These fibers are called hybrid. Those that contain MHCI and MHCIIa are classified as type IC (MHCI>MHCIIa) or type IIC (MHCIIa>MHCI). Those that contain MHCIIa and MHCIIId are type IIAD (MHCIIa>MHCIIId) or IIDA (MHCIIId>MHCIIa), and those that contain MHCIIId and MHCIIb are type IIDB (MHCIIId>MHCIIb) or IIBD (MHCIIb>MHCIIId) (Pette and Staron 2000). This suggests the existence of a continuity of fiber types from the slowest to the fastest, with the hybrid ones closing the gaps left by pure fibers: **I↔Ic↔Ic↔IIa↔IIad↔IId↔IIdb↔IIb** (Pette and Staron

2000). Although hybrid fibers are not present in very high percentages compared to the pure ones, current data indicate the presence of considerable numbers of these fibers in adult animals (Biral et al. 1988, Staron 1991, Galler et al. 1994, Staron et al. 1999). Single fiber analysis in adult rats has revealed that at least 3% of the fibers contain MHCIIa+MHCIId and 10% contain MHCIId+MHCI Ib (Staron and Pette 1993).

On this basis, in the present study we present the composition of the soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (GAS) muscles of C57BL6J mice as determined by the mTAPase histochemical technique in combination with the biochemical technique of electrophoresis.

Material and Methods

Animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Biology Institute, State University of Campinas. Eight C57BL6J male mice were obtained from the Central Animal House of the State University of Campinas and kept in standard cages at a constant temperature of 25° C, with free access to food and water until they completed 3 months of age. The animals were then sacrificed by excess ether inhalation and their SOL, EDL, TA and GAS muscles were removed from the right hind limb. The muscles were weighed, oriented in tragacanth gum and immediately frozen in isopentane cooled to -159°C in liquid nitrogen, and stored frozen at -74°C for later analysis.

Fiber type and cross-sectional area determination

The muscles were placed in a cryostat at -24°C and left there for one hour before processing. The midpoint of the muscles was cut into 12 µm-thick sections and the main fiber types and subtypes (I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID and IIB) were delineated by the mTAPase technique (Staron and Pette 1993) after preincubation at pH 4.35, 4.55 (Brooke and Kaiser 1970) and 10.35 (Guth and Samaha 1970). The sections preincubated at pH 4.55 were mounted photographically and, in combination with the sections preincubated at pH 4.35 and 10.35, were examined for the determination of the number and percentage of each fiber type. Cross-sectional areas were then measured in at least 50 fibers of each type using the Image Pro Express software (Media Cybernetics®).

MHC analysis

After sections were collected for histochemical analysis, 5 to 15 sections (12 µm) were collected for biochemical analysis. The sections were placed in 0.5 ml of a medium of the following composition: 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) 2 mercaptoethanol and 2.3% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS) in 62.5 mM Tris/HCl buffer, pH-6.8. The mixture was then shaken (1') and heated (10') to 60°C. Small extract portions (7-10 µl) were then submitted to electrophoresis on 7-10% gradient polyacrylamide gels, run for 20 hours at 120 V, and stained with Coomassie Blue (Bar and Pette 1988). MHC were identified according to their apparent molecular masses compared with those of marker proteins. The gels were scanned with a Sharp scanner and the percentage of each myosin chain was indirectly determined with the Image Master software (Amersham Pharmacia).

Statistical analysis

The mean $\pm$ SD was obtained for animal and muscle weight, number and percentage of the different fiber types, percent myosin chain of each muscle and cross-sectional area of at least 50 fibers of each type for each sample.

Results

Muscle weights

The GAS muscle was the largest, followed by the TA, EDL and SOL muscles. The weight of the GAS muscle refers to the lateral and medial portions (Table 1).

Fiber type distribution

The SOL muscle was composed of type I, IIA, IIAD and IID fibers, with a predominance of type I (38.42%) and IIA (37.9%) fibers. However, a considerable population of type IID (4.95%) and IIAD (18.72%) fibers was also observed. The EDL muscle was predominantly composed of type IIB and IIDB fibers, 66.23% and 21.92%, respectively. A smaller number of type IIAD (7.09%), IC/IIC (2.63%) and I (0.59%) fibers was also observed. The TA muscles was predominantly composed of type IIB (58.54%) and IIDB (31.26%) fibers, while type IIAD, IID and IIA fibers were observed in smaller numbers, i.e., 4.86%, 2.44% and 1.71%, respectively. Type IIB (55.08%) and IIDB (18.41%) fibers were the most numerous in the GAS muscle, followed by type IIAD, I, IIA and IID fibers (12.36%, 5.74%, 5.56% and 2.78%, respectively) (Fig. 1 and Table 2).

Cross-sectional areas

Table 3 shows the cross-sectional area of type I, IC/IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB and IIB fibers in the muscles of C57BL6J mice. In the SOL muscle, type I fibers showed the largest cross-sectional area, while in the EDL, TA and GAS muscles type IIB fibers showed the largest cross-sectional area, followed by IIDB, IID, IIAD and IIA fibers (Table 2).

MHC

Some rat muscles and the diaphragm of C57BL6J mice were used as control for MHC analysis. The SOL muscle showed a predominance of the IIa isoform (59.63%) followed by MHCI (39.3%) and MHCIId (1.06%). In the EDL muscle, the IIb isoform corresponded to 90.05%, followed by IIa (9.78%) and I (0.16%). In the TA and GAS muscles, the IIb isoform corresponded to 77.94% in both muscles, followed by the IIa isoform, which corresponded to 22.05% and 20.47%, respectively. In the GAS muscle, the I isoform was also observed, corresponding to 1.58% (Fig. 2 and Table 4).

Discussion

Only a few studies have been conducted thus far to investigate the muscles of C57BL6J mice (Dribin and Simpson 1977, Parry and Parslow 1981, Webster and Bressler 1985, Redenbach et al. 1988, Parry and Wilkinson 1990, Parry and Zardini 1990, Hämäläinen and Pette 1993, Zardini and Parry 1994, Campos et al. 1995). Parry and Wilkinson (1990) stated that the EDL muscle of these mice weighs 0.012 g and the SOL muscle 0.011 g, while Webster and Bressler (1985) reported 0.060 g for the TA muscle. In the present

study, the SOL, EDL, TA, and GAS muscles weighed 0.012 g, 0.015 g, 0.051 g and 0.169 g, respectively, in agreement with literature data.

To our knowledge, only Hämäläinen and Pette (1993) classified the types and subtypes of the muscle fibers of C57BL6J mice using the mTAPase technique. However, the major objective of these investigators was not to delineate of the number and percentage of muscle fibers, but rather to compare four different methods used for the mTAPase reaction. Other studies also classified the fibers of the SOL (Parry and Parslow 1981; Campos et al. 1995), EDL (Redenbach et al. 1988, Parry and Parslow 1981, Campos et al. 1995), TA (Parry and Wilkinson 1990) and GAS (Parry and Parslow 1981) muscles of C57BL6J mice. Several reactions were used in the cited studies, such as mTAPase, NADH, SDH, or monoclonal antibodies for the delineation of fiber types. Different denominations were also used to classify the fibers, such as red, intermediate or white, oxidative or glycolytic, type I, IIA and IIB, etc.

In the present study, the SOL muscle of mice, in contrast to other mammals in general, showed type IID (4.95%) and IIAD (18.72%) fibers. In the EDL, TA and GAS muscles there was a predominance of type II fibers. On average, 59.95% of the fibers were classified as type IIB, 23.86% as IIDB, 2.06% as IID, 8.10% as IIAD, and 2.61% as IIA in the three muscles. Type I fibers were also present in the GAS (5.74%), TA (0.71%) and EDL (0.59%) muscles. Parry and Zardini (1990) and Zardini and Parry (1994), using monoclonal antibodies, concluded that the TA and EDL muscles of C57BL6J mice contain type IID fibers at the 1/3 proportion. These investigators did not consider the intermediate types IIAD and IIDB. If we consider these three fiber types and their numbers detected by us in the EDL and TA as a whole, our data are quite close to those reported in the literature.

Table 3 shows that the cross-sectional area of type I fibers was the largest in the SOL muscle, whereas in the EDL, TA and GAS muscles type IIB fibers showed the largest cross-sectional area. By comparing the mean fiber area of the four muscles (Table 3), we can see that the largest was that of SOL ($1777 \mu\text{m}^2$), followed by GAS ($1609 \mu\text{m}^2$), TA ($1519 \mu\text{m}^2$) and EDL ($746 \mu\text{m}^2$). Parry and Wilkinson (1990) detected an area of $4378 \mu\text{m}^2$ for type IIB fibers in the superficial region of the TA muscle and an area of $3946 \mu\text{m}^2$ in the deep region. For other fiber types, the area detected by these investigators was $1572 \mu\text{m}^2$ on the surface and $1487 \mu\text{m}^2$ in the deep region. If we compare these data with those available for type IIB fibers in general, we will see that there is a considerable difference. In the TA muscles we observed $2534 \mu\text{m}^2$ for type IIB fibers versus $4378 \mu\text{m}^2$ reported by the cited authors. According to Staron et al. (1999), the cross-sectional area of muscle fibers depends on animal size and age. These same investigators detected a mean area of $2848 \mu\text{m}^2$ for type IIB fibers in the TA muscle of Fisher 344 rats, in agreement with the present results. Pullen (1997) also reported data compatible with ours for these fiber types.

In the electrophoretic analysis of the muscle extracts, the diaphragm of C57BL6J mice and some samples of Wistar rat muscles were used as control. Relative quantification showed a predominance of the IIa isoform in the SOL muscle (59.63%), followed by the I (39.3%) and IId (1.06%) isoforms. In the EDL, TA and GAS muscles, the IIB isoform predominated (90.04%, 77.94% and 77.94%, respectively), followed by the IIa isoform (9.78%, 22.05% and 20.47%, respectively). The I isoform also was clearly visible in the EDL (0.16%) and GAS (1.58%) muscles.

The separation of three distinct isoforms was observed in mouse muscles (Fig. 2). In the SOL and DIA muscles, the isoform that migrated between the IIa and I isoforms was less evident than in the EDL, TA and GAS muscles. However, the migrating distance of

this myosin, which is positioned between the IIa and I isoforms, was practically the same in all muscles. The separation of four isoforms was observed in rat muscles. When the isoforms with the lowest migration distance were compared, a clear separation of isoforms IIa and IId was observed in rat muscles, but not in mouse muscles. According to Zardini and Parry (1994) and Parry and Zardini (1990), the diaphragm muscle of C57BL6J mice does not present the IIb isoform and if we assume that the SOL, by being a slow contraction muscle, does not have fibers of types IIB and IIDB, as confirmed by histochemical analysis, we may suggest that the isoform positioned between isoforms IIa and I in the SOL and DIA muscles of mice is an isoform of type IId. On the other hand, since the EDL, TA and GAS muscles are predominantly fast contraction muscles with a larger number of type IIB and IID fibers, as confirmed by mTAPase, we may suggest that these muscles present the IId and IIb isoforms but, under the laboratory conditions used for this analysis, they migrated together and did not show adequate separation. However, a more appropriate analysis of these muscles is necessary using single fiber analysis techniques or monoclonal antibodies for a better understanding of these isoforms.

Acknowledgement Research supported by FAPESP, Grant 98/13618-0.

References

- Baldwin KM, Haddad F (2001) Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345-357
- Bar A, Pette D (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155

- Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J* 250: 307-308
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18:670-672
- Campos GER, Pai VD, Freitas V (1995) Histochemical analysis of the extensor digitorum longus muscle of mice after crushing of the sciatic nerve. *Braz J Morphol Sci* 12: 52-57
- Dribin LB, Simpson SB (1977) Histochemical and morphological study of dystrophic (C57BL/6J dy2j/dy2j) and normal muscle. *Exp Neurol* 56: 480-497
- Farnbach GC, Brown MJ, Barchi RL (1978) A maturational defect in passive membrane properties of dystrophic mouse muscle. *Exp Neurol* 62: 539-554
- Galler S, Schmitt T, Pette D (1994) Stretch activation, unloaded shortening velocity, and myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle fibers. *J Physiol (Lond)* 478: 513-521
- Guth L, Samaha FJ (1970) Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin TAPase. *Exp Neurol* 28: 365-367
- Hämäläinen N, Pette D (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat and rabbit. *J Histochem Cytochem* 41: 733-743
- Marques MJ, Da Silva C F, Santo Neto U (1996) An ultrastructural study of the temporal progress of neuromuscular junction regeneration after sciatic nerve transection and tubulization repair. *Braz J Morphol Sci* 13: 181-187

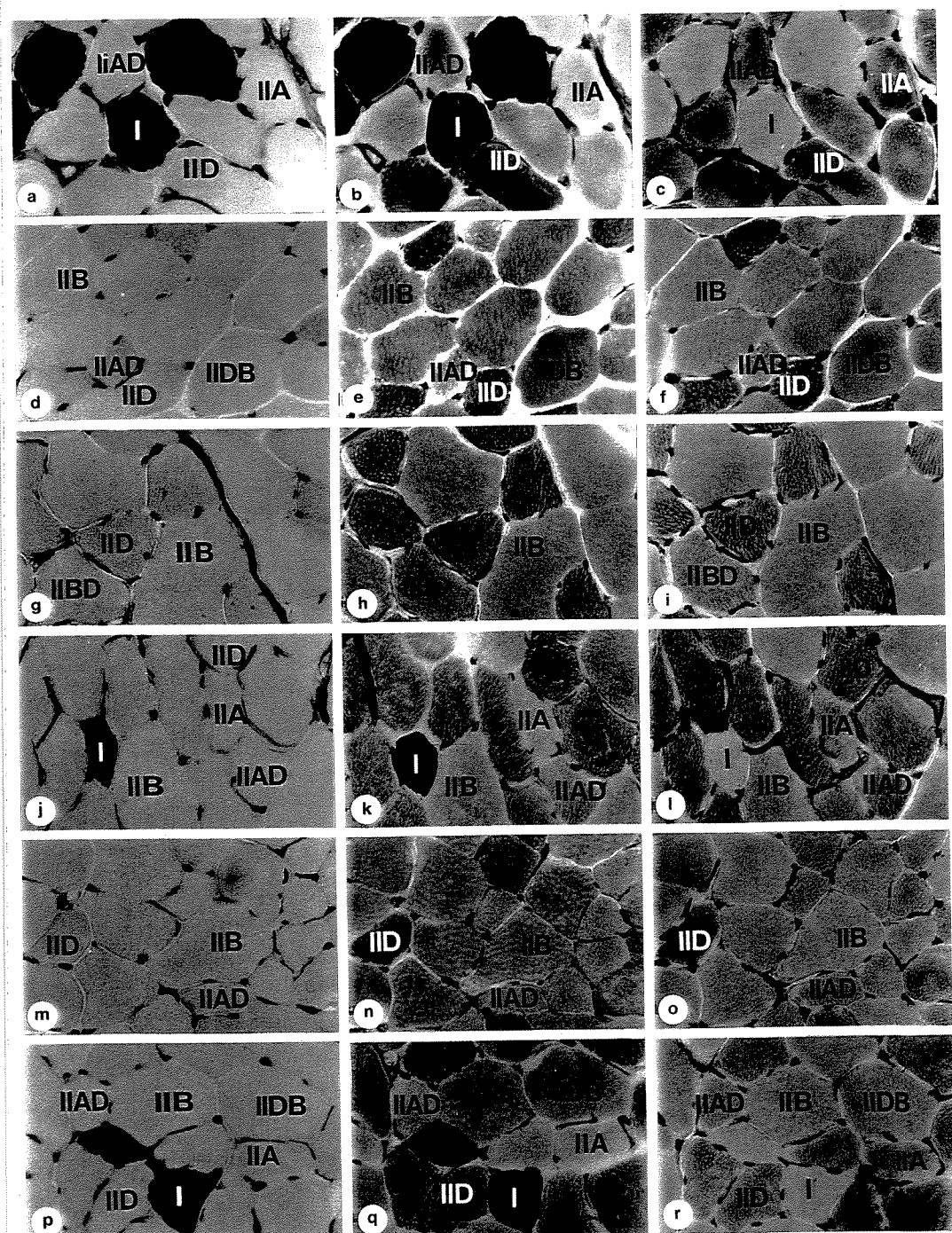
- Parry DJ, Parslow HG (1981) Fiber type susceptibility in the dystrophic mouse. *Exp Neurol* 73: 674-685
- Parry DJ, Wilkinson RS (1989) The effect of reinnervation on the distribution of muscle fibre types in the tibialis anterior muscle of the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 596-602
- Parry DJ, Zardini D (1990) Characterization of IIX fibres in mouse muscles. In: Pette D. (ed) *The Dynamic State of Muscle Fibers*. de Gruyter, Berlin, pp 343-354.
- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500-509
- Pette D, Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115: 359-372
- Pullen AH (1977) The distribution and relative sizes of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. *J Anat* 123: 467-486
- Redenbach DM, Ovalle WK, Bressler BH (1988) Effect of neonatal denervation on the distribution of fiber types in a mouse fast-twitch skeletal muscle. *Histochemistry* 89: 333-342
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77: 493-501
- Staron RS (1991) Correlation between myofibrillar TAPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96: 21-24
- Staron RS, Pette D (1986) Correlation between myofibrillar TAPase activity and myosin heavy chain composition in single rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86: 19-23
- Staron RS, Pette D (1993) The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100: 149-153

- 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. *Histochem Cell Biol* 111: 117-123
- Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92: 453-457
- Webster DMS, Bressler BH (1985) Changes in isometric contractile properties of extensor digitorum longus and soleus muscles of C57BL6J mice following denervation. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 681-686
- Zardini MD, Parry DJ (1994) Identification, distribution, and myosin subunit composition of type IIx fibers in mouse muscles. *Muscle & Nerve* 17: 1308-1316

Figure legends

Figure 1 Serial cross sections of the SOL (a-c) and EDL (d-f) muscles, superficial area of the TA muscle (g-i), deep area of the TA muscle (j-l), superficial area of the GAS muscle (m-o), and deep area of the GAS muscle (p-r). mTAPase at pH 4.35 (a, d, g, j, m, p), 4.55 (b, e, h, k, n, q) and 10.35 (c, f, i, l, o, r). I – fiber of type I, IIA – IIA, IIAD – IIAD, IID – IID, IIDB – IIDB and IIB – IIB. 400X.

Figure 2 Electrophoretic separation of myosin heavy chains (MHC) of the plantar (p), soleus (s), diaphragm (d), extensor digitorum longus (e), tibialis anterior (t) and gastrocnemius muscles (g). Rat (R), Mouse (M), MHCI isoform of type I, MHCIIa – IIa, MHCIIb – IIb and MHCIIc – IIc.



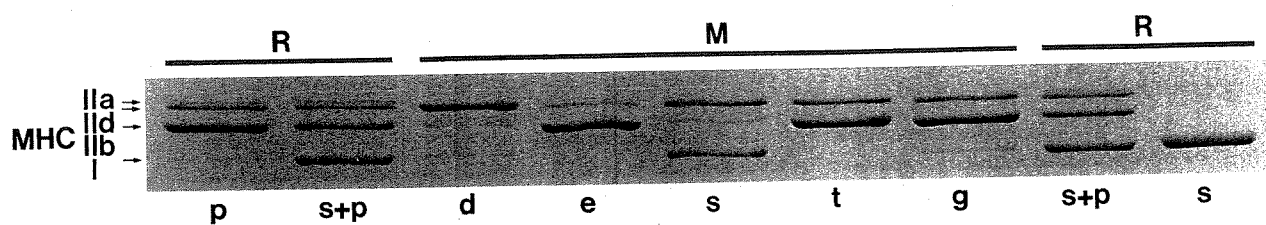


Table 1 Weight (g) of the animals and of the SOL, EDL, TA and GAS muscles. Values are reported as mean $\pm$ SD (n-8).

Animals	SOL	EDL	TA	GAS
26.26 $\pm$ 1.68	0.012 $\pm$ 0.003	0.015 $\pm$ 0.003	0.051 $\pm$ 0.006	0.169 $\pm$ 0.013

Table 2 Percentage of type I, IC/IIIC, IIA, IIAD, IID, IIDB and IIB fibers in the SOL, EDL, TA and GAS muscles (n-8).

	I	IC/IIIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
SOL	38.42	-	37.9	18.72	4.95	-	-
EDL	0.59	2.63	0.57	7.09	0.96	21.92	66.23
TA	0.71	0.46	1.71	4.86	2.44	31.26	58.54
GAS	5.74	0.05	5.56	12.36	2.78	18.41	55.08

Table 3 Area of a crossl section (μm^2) of type I, IC/IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB and IIB fibers in the SOL, EDL, TA and GAS muscles(n-8). Values are reported as mean $\pm$ SD

	I	IC/IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB	Média
SOL	2037 $\pm$ 218	-	1714 $\pm$ 282	1636 $\pm$ 287	1724 $\pm$ 871	-	-	1777 $\pm$ 177
EDL	473 $\pm$ 32	563 $\pm$ 100	482 $\pm$ 55	734 $\pm$ 394	673 $\pm$ 260	651 $\pm$ 138	1652 $\pm$ 277	746 $\pm$ 410
TA	1056 $\pm$ 439	1038 $\pm$ 154	1621 $\pm$ 974	1480 $\pm$ 829	1515 $\pm$ 694	1395 $\pm$ 376	2534 $\pm$ 315	1519 $\pm$ 500
GAS	1592 $\pm$ 302	1628 $\pm$ 850	1251 $\pm$ 131	1184 $\pm$ 205	1930 $\pm$ 366	1482 $\pm$ 253	2201 $\pm$ 140	1609 $\pm$ 360

Table 4 Relative percentage of myosin heavy chains (MHC) in the SOL, EDL, TA and GAS muscles (n-8). Values are reported as mean $\pm$ SD. MHCI-type I isoform, MHCIIa - IIa, MHCIIc - IId and MHCIIb - IIb.

Muscles	MHCI	MHCIIa	MHCIIc	MHCIIb
SOL	39.3 $\pm$ 8.28	59.63 $\pm$ 9.14	1.06 $\pm$ 1.99	-
EDL	0.16 $\pm$ 0.47	9.78 $\pm$ 4.83	-	90.04 $\pm$ 4.85
TA	-	22.05 $\pm$ 10.68	-	77.94 $\pm$ 10.68
GAS	1.58 $\pm$ 2.04	20.47 $\pm$ 8.92	-	77.94 $\pm$ 10.85

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Considerações Finais

Até o momento, apenas alguns estudos (Dribin and Simpson 1977, Parry and Parslow 1981, Webster and Bressler 1985, Redenbach et al. 1988, Parry and Wilkinson 1989, Parry and Zardini 1990, Hämäläinen and Pette 1993, Zardini and Parry 1994, Campos et al. 1995) analisaram músculos de camundongos da linhagem C57BL6J. No presente estudo, o peso do músculo SOL, EDL, TA, e GAS, foram de 0.012g, 0.015g, 0.051g e 0.169g, respectivamente, o que parece ser coerente com os dados encontrados na literatura.

De acordo com a literatura pesquisada, apenas Hämäläinen and Pette (1993) classificaram, através da técnica da mATPase, os tipos e subtipos de fibras musculares de músculos de camundongos C57BL6J. No presente estudo, o músculo SOL dos camundongos, diferentemente de outros mamíferos em geral, apresentou fibras dos tipos IID (4.94%) e IIAD (18.72%). Nos músculos EDL, TA e GAS, houve a predominância de fibras do tipo II. Em média, nos três músculos, 58.45% das fibras foram classificadas como do tipo IIB, 24.83% como IIDB, 2.09% como IID, 8.41% como IIAD e 2.63% como IIA. As fibras do tipo I também estiveram presentes no músculo GAS (5.74%), TA (0.71%) e EDL (0.67%).

Quanto à área de secção transversal das fibras, a tabela 3 nos mostra que no músculo SOL as fibras do tipo I foram as maiores, enquanto que no EDL, TA e GAS, foram as do tipo IIB. Comparando-se a área média das fibras nos quatro músculos (Tabela 3), notou-se que a maior foi a do SOL (1749 μm^2), seguida do GAS (1609 μm^2), TA (1504 μm^2) e EDL (746 μm^2), respectivamente.

Na análise eletroforética do extrato dos músculos utilizou-se como controle o diafragma dos camundongos C57BL6J e algumas amostras de músculos de ratos Wistar. A quantificação relativa mostrou no SOL dos camundongos, predomínio da isoforma IIa (59.63%) seguida de I (39.30%) e IId (1.06%). Nos músculos EDL, TA e GAS, a predominância foi da isoforma IIb com 90.04%, 77.94% e 77.94%, seguida da isoforma IIa com 9.78%, 22.05% e 20.47%, respectivamente. A isoforma I também ficou evidente nos músculos EDL (0.16%) e GAS (1.58%).

Notou-se que houve a separação de três isoformas distintas nos músculos dos camundongos (Fig. 2). No SOL e DIA, a isoforma que migrou entre as isoformas IIa e I ficou menos evidente do que no EDL, TA e GAS. Entretanto, a distância de migração desta miosina, que se posiciona entre a isoforma IIa e I, é praticamente a mesma em todos os músculos. Nas amostras dos ratos notou-se a separação de quatro isoformas. Comparando-se as isoformas com menor distância de migração, notou-se nos ratos a evidente separação das isoformas IIa e IId, mas não nos músculos dos camundongos. Segundo Zardini and Parry (1994) e Parry and Zardini (1990) o músculo diafragma dos camundongos C57BL6J não apresenta a isoforma IIb. Admitiu-se, então que o músculo SOL por ser um músculo de contração lenta não possui fibras dos tipos IIB e IIDB, como foi comprovado pela análise histoquímica, pode-se sugerir que a isoforma posicionada entre as isoformas IIa e I no SOL e no DIA dos camundongos é a isoforma do tipo IId. Por outro lado, sendo os músculos EDL, TA e GAS predominantemente de contração rápida, com maior número de fibras dos tipos IIB e IID, comprovado pela mATPase, pode-se sugerir que esses músculos apresentam as isoformas IId e IIb, mas que nas condições laboratoriais em que foram analisados, migraram conjuntamente e não mostraram uma separação adequada.

Faz-se necessário, portanto uma análise mais apropriada desses músculos através do emprego de técnicas para estudo de fibras isoladas (single fiber analysis), ou de anticorpos monoclonais para um melhor entendimento dessas isoformas e seus mecanismos de migração pela eletroforese.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- Armstrong RB, Phelps RO (1984) Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171: 259-272
- Asmussen G, Traub I, Pette D (1993) Electrophoretic analysis of myosin heavy chain isoform patterns in extraocular muscles of the rat. *FEBS Lett* 335: 243-245
- Baldwin KM, Haddad F (2001) Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345-357
- Bar A, Pette D (1988) Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235: 153-155
- Bárány M, (1967) ATPase activity of myosin correlate with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: 197-218
- Barnard RJ, Edgerton VR, Furukawa T, Peter JB (1971) Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am J Physiol (Londres)* 213: 455-474
- Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J* 250: 307-308
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18:670-672
- Campos GER, Pai VD, Freitas V (1995) Histochemical analysis of the extensor digitorum longus muscle of mice after crushing of the sciatic nerve. *Braz J Morphol Sci* 12: 52-57

- De Nardi CS, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, Schiaffino S (1993) Type 2x-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol* 123:823-835.
- Delgado JM, Sciote JJ, Carrol WR, Esclamado RM (1995) Atypical myosin heavy chain in rat laryngeal muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 237-245
- Dribin LB, Simpson SB (1977) Histochemical and morphological study of dystrophic (C57BL/6J dy2j/dy2j) and normal muscle. *Exp Neurol* 56: 480-497
- Eisenberg BR (1983) Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. *Handbook of physiology* 10: 73-112
- Engel WK (1962) The essentiality of histo-and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology* 12: 778-784
- Farnbach GC, Brown MJ, Barchi RL (1978) A maturational defect in passive membrane properties of dystrophic mouse muscle. *Exp Neurol* 62: 539-554
- Galler S, Schmitt T, Pette D (1994) Stretch activation, unloaded shortening velocity, and myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle fibers. *J Physiol (Lond)* 478: 513-521
- Guth L, Samaha FJ (1969) Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 25: 138-152
- Guth L, Samaha FJ (1970) Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol* 28: 365-367
- Hämäläinen N, Pette D (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat and rabbit. *J Histochem Cytochem* 41: 733-743

- Hostler D, Schwirian C I, Campos G E R, Toma K, Matthew T C, Hagerman G H, Hagerman F C, Staron R S (2001) Skeletal muscle adaptation in elastic resistance-trained young men and women. *Eur J Appl Physiol* 86: 112-118
- Kirkeby S (1996) A monoclonal anticarbohydrate antibody detecting superfast myosin in the masseter muscle. *Cell Tissue Res* 283: 85-92
- Lieber RL (1992) *Skeletal Muscle Structure and Function: Implications for rehabilitation and sports medicine* Ed Williams & Wilkins Baltimore
- Lucas CA, Rughani A, Roh JFY (1995) Expression of extraocular myosin heavy chain in rabbit laryngeal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 16: 368-378
- Marques MJ, Da Silva C F, Santo Neto H (1996) An ultrastructural study of the temporal progress of neuromuscular junction regeneration after sciatic nerve transection and tubulization repair. *Braz J Morphol Sci* 13: 181-187
- Mascarello F, Carpena E, Veggetti A, Rowlerson A, Jenny E (1982) The tensor tympani muscle of cat and dog contains IIM and slow-tonic fibers: na unusual combination of fibre types. *J Muscle Res Cell Motil* 3: 363-374
- Mascarello F, Carpena E, Veggetti A, Rowlerson A, Jenny E (1983) An immunohistochemical study of the middle ear muscles of some carnivores and primates, with special reference to the IIM and slow-tonic fibre types. *J Anat* 137: 95-108
- Müntener M (1979). Variable pH dependence of the myosin-ATPase in different muscles of the rat. *Histochemistry* 62: 299-304
- Parry DJ, Parslow HG (1981) Fiber type susceptibility in the dystrophic mouse. *Exp Neurol* 73: 674-685

- Parry DJ, Wilkinson RS (1989) The effect of reinnervation on the distribution of muscle fibre types in the tibialis anterior muscle of the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 596-602
- Parry DJ, Zardini D (1990) Characterization of IIX fibres in mouse muscles. In: Pette D. (ed) *The Dynamic State of Muscle Fibers*. Gruyter, Germany, pp 343-354.
- Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal-muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627-2733
- Pette D, Staron RS (1990) Cellular and Molecular Diversities of Mammalian Skeletal Muscle Fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*: v. 116
- Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500-509
- Ranvier L (1873) Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *C R Acad Sci Paris* 77: 1030-1034.
- Redenbach DM, Ovalle WK, Bressler BH (1988) Effect of neonatal denervation on the distribution of fiber types in a mouse fast-twitch skeletal muscle. *Histochemistry* 89: 333-342
- Rowlerson A, Pope P, Murray J, Whalen RG, Weeds AG (1981) A novel myosin present in cat jaw-closing muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2: 415-438
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77: 493-501
- Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 197-205

- Seidel JC (1967) Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. I, inactivation of myosin from red muscles under mild alkaline conditions. *J Biol Chem* 242: 5623-5629
- Shelton GD, Cardinet GH, Bandman E (1988) Expression of fiber type specific proteins during ontogeny of canine temporalis muscle. *Muscle Nerve* 11:247-254
- Sréter FA, Seidel JC, Gergely J (1966) Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. I, Adenosine Triphosphatase activity. *J Biol Chem* 241: 5772-5776
- Staron RS, Pette D (1986) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86: 19-23
- Staron RS, Pette D (1987) Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Eur J Appl Physiol* 408: 444-450
- Staron RS (1991) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96: 21-24
- Staron RS, Pette D (1993) The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100:149-153
- 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. *Histochem Cell Biol* 111: 117-123
- Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92: 453-457
- Webster DMS, Bressler BH (1985) Changes in isometric contractile properties of extensor digitorum longus and soleus muscles of C57BL6J mice following denervation. *Can J Physiol Pharmacol* 63: 681-686

- Wieczorek DF, Periasamy M, Butler-Browne GS, Whalen RG, Nadal-Ginard B (1985) Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature. *J Cell Biol* 101: 618-629
- Zardini MD, Parry DJ (1994) Identification, distribution, and myosin subunit composition of type IIx fibers in mouse muscles. *Muscle Nerve* 17: 1308-1316

7. ANEXOS

7. Anexos:

Tabela 1. Peso dos animais e dos músculos (g): SOL, EDL, TA e GAS (n=8).

Animal	Peso	SOL	EDL	TA	GAS
C1	28,7	0,013	0,017	0,051	0,186
C2	26,0	0,010	0,014	0,053	0,168
C3	25,0	0,017	0,018	0,055	0,177
C4	25,7	0,017	0,020	0,063	0,179
C5	25,0	0,009	0,013	0,048	0,161
C6	24,4	0,011	0,017	0,047	0,153
C7	26,4	0,010	0,012	0,042	0,151
C8	28,9	0,010	0,013	0,054	0,180
Média	26,262	0,012	0,015	0,0516	0,169
DP	1,688	0,003	0,0028	0,0062	0,013

Tabela 2. Número e porcentagem de fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, no músculo SOL (n=8).

SOL	I Nº- %	IC/IIC Nº- %	IIA Nº- %	IIAD Nº- %	IID Nº- %	IIDB Nº- %	IIB Nº- %	Total Nº- 100%
C1	148-31,223	-	192-40,506	107-22,573	27-5,696	-	-	474
C2	146-44,648	-	136-41,590	36-11,009	9-2,752	-	-	327
C3	140-36,649	-	165-43,193	72-18,848	5-1,308	-	-	382
C4	175-36,307	-	188-39,004	85-17,634	34-7,053	-	-	482
C5	100-38,910	-	76-29,571	64-24,902	17-6,614	-	-	257
C6	198-47,826	-	143-34,541	64-15,458	9-2,173	-	-	414
C7	160-37,383	-	146-34,112	90-21,028	32-7,476	-	-	428
C8	191-37,450	-	195-38,235	95-18,627	29-5,686	-	-	510
Total	1258-38,423	-	1241-37,904	613-18,723	162-4,948	-	-	3274

Tabela 3. Número e porcentagem de fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, no músculo EDL (n=8).

EDL	I Nº- %	IC/IIC Nº- %	IIA Nº- %	IIAD Nº- %	IID Nº- %	IIDB Nº- %	IIB Nº- %	Total Nº- 100%
C1	7-1,026	-	5-0,733	25-3,665	15-2,199	180-26,392	450-65,982	682
C2	1-0,226	19-4,298	6-1,357	43-9,728	7-1,583	78-17,647	288-65,158	442
C3	-	19-4,622	-	19-4,622	11-2,676	104-25,304	258-62,773	411
C4	4-0,653	11-1,797	5-0,816	44-7,189	-	105-17,156	443-72,385	612
C5	4-0,828	7-1,449	6-1,242	53-10,973	-	77-15,942	336-69,565	483
C6	-	7-1,275	1-0,182	64-11,657	5-0,910	168-30,601	304-55,373	549
C7	-	21-4,635	-	12-2,649	-	117-25,827	303-66,887	453
C8	8-2,539	22-6,9849	-	25-7,936	-	52-16,507	208-66,031	315
Total	24-0,608	106-2,685	23-0,582	285-7,220	38-0,962	881-22,320	2590-65,619	3947

Tabela 4. Número e percentagem de fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, no músculo TA (n=8).

TA	I Nº- %	IC/IIC Nº- %	IIA Nº- %	IIAD Nº- %	IID Nº- %	IIDB Nº- %	IIB Nº- %	Total Nº- 100%
C1	-	-	8-0,542	34-2,306	41-2,781	491-33,310	900-61,058	1474
C2	-	2-0,163	8-0,655	32-2,620	21-1,719	356-29,156	802-65,683	1221
C3	1-0,052	-	27-1,407	51-2,659	32-1,668	779-40,615	1028-53,597	1918
C4	17-1,072	-	18-1,135	63-3,974	69-4,353	667-42,082	751-47,381	1585
C5	12-0,776	-	17-1,099	79-5,109	49-3,169	590-38,163	799-51,681	1546
C6	5-0,288	7-0,403	25-1,440	95-5,472	62-3,571	530-30,529	1012-58,294	1736
C7	59-2,503	49-2,078	115-4,879	267-11,327	34-1,442	245-10,394	1588-67,373	2357
C8	-	3-0,216	9-0,65	22-1,59	15-1,084	475-34,345	859-62,111	1383
Total	94-0,711	61-0,461	227-1,717	643-4,863	323-2,443	4133-31,263	7739-58,54	13220

Tabela 5. Número e percentagem de fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, no músculo GAS (n=8).

GAS	I Nº- %	IC/IIC Nº- %	IIA Nº- %	IIAD Nº- %	IID Nº- %	IIDB Nº- %	IIB Nº- %	Total Nº- 100%
C1	36-3,308	1-0,091	60-5,514	142-13,051	61-5,606	221-20,312	567-52,113	1088
C2	90-6,13	-	28-1,907	155-10,558	24-1,634	247-16,825	924-62,942	1468
C3	96-6,736	-	76-5,333	196-13,754	56-3,929	269-18,877	732-51,368	1425
C4	88-6,712	2-0,152	110-8,39	145-11,060	59-4,5	236-18,001	671-51,182	1311
C5	82-8,401	-	69-7,069	147-15,061	28-2,868	194-19,877	456-46,721	976
C6	57-4,695	2-0,164	78-6,425	126-10,378	20-1,647	246-20,263	685-56,425	1214
C7	55-4,637	-	56-4,721	170-14,333	18-1,517	238-20,067	649-54,721	1186
C8	80-5,336	-	89-5,937	176-11,741	17-1,134	221-14,743	916-61,107	1499
Total	584-5,744	5-0,049	566-5,567	1257-12,363	283-2,783	1872-18,412	5600-55,08	10167

Tabela 6. Áreas de secção transversal (μm^2) das fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB músculo SOL (n=8).

SOL	I	IC/IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
C1	2069±482	-	1622±397	1389±371	1573±206	-	-
C2	1015±415	-	1865±422	1651±399	1922±302	-	-
C3	1836±357	-	1846±446	1626±455	3080±0	-	-
C4	2386±445	-	2220±473	2217±555	2271±468	-	-
C5	2246±519	-	1747±510	1865±424	1666±434	-	-
C6	1941±476	-	1285±313	1384±371	-	-	-
C7	1742±486	-	1454±532	1391±682	1384±619	-	-
C8	2159±627	-	1675±532	1563±617	1900±258	-	-
Media	1924±424	-	1714±282	1635±287	1970±566	-	-

Tabela 7. Área de secção transversal (μm^2) das fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, do músculo EDL (n=8).

EDL	I	IC/IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
C1	457±0	-	529±100	480±100	920±0	628±173	1572±307
C2	-	603±174	524±67	846±386	878±177	946±365	2277±500
C3	-	406±34	-	1645±161	439±102	682±194	1724±343
C4	-	704±188	-	556±208	-	681±237	1613±885
C5	511±82	498±57	413±83	605±202	-	663±178	1669±432
C6	-	548±148	463±0	661±311	457±169	546±143	1366±384
C7	-	656±160	-	379±85	-	578±205	1449±309
C8	451±109	523±143	-	698±216	-	485±117	1544±447
Média	473±32,9	562±100	482±55	733±394	673±261	651±138	1652±277

Tabela 8. Área de secção transversal (μm^2) das fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, do músculo TA (n=8).

TA	I	IC/IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
C1	-	-	2813±1286	2863±802	1604±785	1262±388	2971±857
C2	1088±420	1120±193	1434±412	1130±321	1806±100	1951±672	2916±1132
C3	1069±0	-	977±139	1673±131	1051±297	1366±451	2809±591
C4	946±144	-	812±88	1269±736	979±345	1175±457	2304±668
C5	-	-	742±78	720±133	-	1105±457	2321±614
C6	474±200	872±0	2004±0	1130±800	924±186	1057±262	2146±613
C7	1705±583	949±113	915±251	1236±565	2727±993	2019±614	2449±880
C8	-	1210±52	3267±954	686±181	-	1225±485	2360±704
Media	1056±439	1037±154	1620±974	1338±691	1515±694	1395±376	2534±315

Tabela 9. Área de secção transversal (μm^2) das fibras do tipo I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB e IIB, do músculo GAS (n=8).

GAS	I	IC/IIC	IIA	IIAD	IID	IIDB	IIB
C1	1329±284	-	1182±339	1121±285	1813±850	1249±547	2127±602
C2	1204±333	-	1182±305	940±302	1464±444	1204±648	1949±582
C3	1866±560	-	1158±434	1486±444	2485±181	1705±749	2449±737
C4	1299±350	1027±168	1215±402	1029±334	1626±384	1429±503	2196±777
C5	1811±558	-	1503±356	1465±616	1694±470	1949±881	2262±773
C6	1665±311	2250±29	1321±335	1051±340	1845±209	1277±354	2253±431
C7	1519±331	-	1351±380	1089±447	2126±560	1503±629	2177±753
C8	2042±593	-	1097±714	1293±721	2386±674	1543±717	2198±763
Media	1591±302	1638±864	1251±131	1184±205	1929±366	1482±253	2201±140

Tabela 10. Porcentagem relativa das cadeias pesadas de miosina (MHC) no músculo SOL (n=8).

SOL	MHC I %	MHCIIa %	MHCIIId %	MHCIIb %
C1	27,63	72,37	-	-
C2	41,50	58,50	-	-
C3	43,38	56,62	-	-
C4	25,89	74,11	-	-
C5	41,39	58,23	0,38	-
C6	50,31	47,48	2,21	-
C7	41,49	52,88	5,63	-
C8	42,82	56,88	0,30	-
Média	39,30-8,28	59,63-9,14	1,06-1,99	-

Tabela 11. Porcentagem relativa das cadeias pesadas de miosina (MHC) no músculo EDL (n=8).

EDL	MHC I %	MHCIIa %	MHCIIId %	MHCIIb %
C1	-	2,05	-	97,95
C2	-	3,62	-	96,38
C3	1,33	9,58	-	89,09
C4	-	8,46	-	91,54
C5	-	12,5	-	87,5
C6	-	13,99	-	86,01
C7	-	15,24	-	84,76
C8	-	12,86	-	87,14
Média	0,166-0,47	9,78-4,83	-	90,044-4,85

Tabela 12. Porcentagem relativa das cadeias pesadas de miosina (MHC) no músculo TA (n=8).

TA	MHC I %	MHCIIa %	MHCIIId %	MHCIIb %
C1	-	25,62	-	74,38
C2	-	34,57	-	65,43
C3	-	22,36	-	77,64
C4	-	26,0	-	74,0
C5	-	30,68	-	69,32
C6	-	25,41	-	74,59
C7	-	7,52	-	92,48
C8	-	4,26	-	95,74
Média	-	22,052-10,68	-	77,947-10,68

Tabela 13. Porcentagem relativa das cadeias pesadas de miosina (MHC) no músculo GAS (n=8).

GAS	MHC I %	MHCIIa %	MHCIIId %	MHCIIb %
C1	-	17,48	-	82,52
C2	0,64	14,19	-	85,17
C3	1,52	25,41	-	73,07
C4	-	8,79	-	91,21
C5	4,19	31,66	-	64,15
C6	5,3	34,07	-	60,63
C7	-	15,68	-	84,32
C8	0,99	16,54	-	82,47
Média	1,58-2,048	20,477-8,926	-	77,942-10,85

8. LISTA DE ABREVIACÕES

8. Lista de Abreviações

α GP: enzima utilizada para distinguir fibras musculares baseado em seu potencial glicolítico

μ l: microlitro (unidade de medida de volume)

μ m: micrômetro (unidade de medida de espessura do corte)

μ m²: micrômetro quadrado (unidade de medida da espessura do corte)

ATP: Adenosina Trifosfato

C1 à C8: identificação dos animais utilizados neste trabalho

C57BL6J: linhagem de camundongos utilizados neste trabalho

Continuum: sequência

DIA: músculo Diafragma

EDL: músculo Extensor Longo dos Dedos

FG - fast glycolytic: fibras musculares glicolíticas de contração rápida

FOG – fast oxidative glycolytic: fibras glicolíticas oxidativas de contração rápida

Gap: comunicação

GAS: músculo gastrocnêmio

I: fibra muscular tipo I, com maior concentração de MHCI do que de MHCIIa

IC: fibra muscular tipo IC

IIA: fibra muscular tipo IIA

IIAD: fibra muscular tipo IIAD, com maior concentração de MHCIIa do que de MHCIIc

IIB: fibra muscular tipo IIB

- IIBD:** fibra muscular tipo IIBD, com maior concentração de MHCIIb do que de MHCIIId
- IIC:** fibra muscular tipo IIC, com maior concentração de MHCIIa do que de MHCI
- IID:** fibra muscular tipo IID
- IIDA:** fibra muscular tipo IIDA, com maior concentração de MHCIIId do que de MHCIIa
- IIDB:** fibra muscular tipo IIDB, com maior concentração de MHCIIId do que de MHCIIb
- IIX:** outra denominação para fibra muscular tipo IID
- mATPase:** Myofibrillar Adenosine Triphosphatase – enzima presente no músculo, onde sua velocidade de reação permite clasificar músculos como de contração lenta ou rápida.
- MHC:** Myosin Heavy Chain – cadeia pesada de miosina
- MHC fast:** MHC rápida
- MHC slow:** MHC lenta
- MHCI:** MHC tipo I
- MHCIIa:** MHC tipo IIa
- MHCIIb:** MHC tipo IIb
- MHCIIId:** MHC tipo IIId
- MHCIIx:** MHC tipo IIX
- mM:** milimol (unidade de medida de concentração)
- NAD:** Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo
- NADH:** Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Reduzido
- pH:** potencial de hidrigenização
- SDH:** Succinato dehidrogenase
- SDS:** Sodium Dodecylsulfato
- SOL:** músculo Sóleo
- SO – slow oxidative:** fibras musculares oxidativas de contração lenta

TA: músculo Tibial Anterior

Tris/HCl: tris[hidroximetil] aminometano