

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Henrique Borgatto de Almeida Dias

**Morfologia e expressão dos MRFs no músculo esquelético de ratos
submetidos a estímulo atrófico e recuperação por treinamento físico**

MONOGRAFIA

BOTUCATU

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Henrique Borgatto de Almeida Dias

**Morfologia e expressão dos MRFs no músculo esquelético de ratos
submetidos a estímulo atrófico e recuperação por treinamento físico**

**Monografia apresentada ao Instituto
de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof. Dr. Maeli Dal Pai Silva

BOTUCATU

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS.

TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU -

UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Dias, Henrique Borgatto de Almeida

Morfologia e expressão dos MRF's no músculo esquelético de ratos submetidos a estímulo atrofico e recuperação por treinamento físico. Henrique Borgatto de Almeida Dias – Botucatu [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientadora: Prof. Dr. Maeli Dal Pai Silva

FAPESP: 2011/17445-0

1. Morfologia 2. Treinamento aeróbio 3. Estímulo atrofico

Palavras-chave: Treinamento aeróbio, Estímulo atrofico, Músculo sóleo

Dedicatória

Dedico este meu trabalho, primeiramente a Deus, que sempre foi e sempre será meu refúgio e minha fortaleza, sustentando-me pra vencer todas as barreiras que me podem surgir; também o dedico aos meus pais, Francisco e Inez, os quais sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Agradecimentos

A Deus, por toda força e determinação que me foi proporcionado.

Aos meus pais e amigos, pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora, Prof. Dr. Maeli Dal Pai Silva, pelos ensinamentos científicos e pela confiança em meu trabalho; e ao meu orientador no exterior, Prof. Dr. Fabien Le Grand, pela oportunidade única de vivência em um laboratório em outro país.

À FAPESP, pelos recursos disponibilizados para a realização do projeto.

Ao Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, ao Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) e ao *Institut Cochin* da *Université Paris Descartes*.

Aos meus colegas de trabalho do LBME e da *Equipe Génétique et Développement du Système Neuromusculaire*.

Epígrafe

"Para se chegar à verdade,
antes tem que se subir pelos degraus dos erros,
é o que acontece com a ciência,
em sua constante busca,
até a exatidão dos resultados."

(Ivan Teorilang)

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO	19
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Animais e Protocolo Experimental.....	19
3.2. Imobilização dos membros traseiros.....	20
3.3. Protocolo do treinamento aeróbio	21
3.4. Dados Anatômicos.....	22
3.5. Análise Morfológica e Área de secção transversal (AST) das fibras musculares...	22
3.6. Imunofluorescência para MyoD, Miogenina e Pax-7.....	23
3.7. Avaliação da expressão dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo	24
3.7.1. Extração e análise da qualidade do RNA.....	24
3.7.2. Reação de Transcrição Reversa dos mRNAs	25
3.7.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (mRNA)	25
3.8. Análise Estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Peso corporal (PC), peso do músculo e consumo alimentar	27

4.2. <i>Análise morfológica</i>	39
4.3. <i>Imunofluorescência para Miogenina, MyoD e Pax 7</i>	43
4.4. <i>Avaliação quantitativa da expressão gênica por qRT-PCR</i>	49
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de figuras

Figura 1. Imagem representativa da Imobilização dos membros inferiores dos animais dos grupos Imobilizado (I), Recuperado 3 e 7 dias (R3 e R7) e Treinados 3 e 7 dias (T3 e T7).....	21
Figura 2. Imagem representativa do treinamento aeróbico com carga dos animais dos grupos T3 e T7.....	24
Figura 3. Peso corporal inicial (PCI) e final (PCF) dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle (C), imobilizado (I), controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3), treinado 3 dias (T3), controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7).....	30
Figura 4. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle (C) e imobilizado (I). Valores expressos em média $\pm$ DP.....	31
Figura 5. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3) e treinado 3 dias (T3) durante o experimento. Valores expressos em média $\pm$ DP.....	30
Figura 6. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7). Valores expressos em média $\pm$ DP.	31
Figura 7. Peso do músculo sóleo entre os grupos C e I. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo C.....	32
Figura 8. Peso do músculo sóleo entre os grupos C3, R3 e T3. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C3.....	33
Figura 9. Peso do músculo sóleo entre os grupos C7, R7 e T7. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C7.....	34
Figura 10. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C e I. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo C.....	35

Figura 11. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C3, R3 e T3. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C3.	36
Figura 12. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C7, R7 e T7. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C7.	37
Figura 13. Corte transversal do músculo sóleo de um animal representativo do grupo controle. Coloração HE. Fibra muscular (acidófilas), perimísio (seta contínua) e endomísio (seta descontínua). Barra 20 μ m. do grupo controle 1ª semana. Coloração HE.	39
Figura 14. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle (C) e imobilizado (I). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo I.....	40
Figura 15. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3) e treinado 3 dias (T3). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo C3.....	41
Figura 16. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo C7.....	42
Figura 17. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites Miogenina+. Núcleos das fibras musculares corados com DAPI (azul) e células satélites indicadas por setas.	43
Figura 18. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites Pax7+. Núcleos das fibras musculares corados com DAPI (azul) e células satélites indicadas por setas.	44
Figura 19. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites MyoD+. Células satélites indicadas por setas.	45
Figura 20. Gel de agarose (1%), demonstrando a qualidade do RNA extraído dos músculos Sóleo e Plantar, grupo Controle, constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S.....	52

Lista de tabelas

Tabela 1. Anticorpos que foram utilizados para a reação de Imunofluorescência.....	26
Tabela 2. Genes que foram analisados pela reação de RT-qPCR.....	28
Tabela 3. Peso dos músculos Sóleo (So) e relação peso do músculo/comprimento da tíbia (Rel So/Ct). Valores expressos em média $\pm$ DP.....	38
Tabela 4. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle (C1 e C2) e Imobilizado (I1 e I2).....	49
Tabela 5. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle 3 dias (C3 e C4) e Recuperado 3 dias (R1 e R2) e Treinado 3 dias (T1 e T2).	50
Tabela 6. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle 7 dias (C5 e C6) e Recuperado 7 dias (R3 e R4) e Treinado 7 dias (T3 e T4).	51

Lista de quadros

Quadro 1. Média das miofibras e das células satélites Pax 7+ e razão entre as médias dos grupos.....	46
Quadro 2. Média das miofibras e das células Miogenina+ e razão entre as médias dos grupos.....	47
Quadro 3. Média das miofibras e das células MyoD+ e razão entre as médias dos grupos.	48
Quadro 4. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos do grupo imobilizado (I) em relação ao grupo controle. A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo <i>versus</i> grupo C (*P < 0,05).....	53
Quadro 5. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos dos grupos recuperado e treinado 3 dias (R3 e T3) em relação ao grupo Controle 3 dias (C3). A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo <i>versus</i> grupo C3 (*P < 0,05). 53	
Quadro 6. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos dos grupos recuperado e treinado 7 dias (R7 e T7) em relação ao grupo Controle 7 dias (C7). A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo <i>versus</i> grupo C7 (*P < 0,05). 54	

Resumo

Pesquisas recentes avançam no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que fundamentam os processos de hipertrofia e atrofia muscular. Tal fato pode contribuir para desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para atenuar ou até mesmo bloquear a perda do tecido muscular associada ao envelhecimento normal e a condições patológicas. Neste contexto, fatores miogênicos, que controlam a atividade das células satélites, têm sido estudados para melhor elucidar os eventos envolvidos na recuperação da massa muscular. Dentre eles, destacam-se os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), os quais têm sido descritos como potenciais mediadores do crescimento muscular. Assim, os objetivos do presente trabalho serão avaliar as adaptações morfofuncionais e a expressão gênica dos MRFs (MyoD e Miogenina) em músculo esquelético (sóleo) submetido a estímulo atrófico seguido de treinamento físico. Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos (80 dias, 250 a 300 g), divididos em 8 grupos (n=8): C: Animais controle 1ª semana; I: Animais imobilizados 1ª semana; C3: Animais controles 3 dias; R3: Animais imobilizados e recuperados por 3 dias; T3: Animais imobilizados e submetidos a exercício por 3 dias; C7: Animais controles 7 dias; R7: Animais imobilizados e subsequentemente recuperados por 7 dias; T7: Animais imobilizados e subsequentemente submetidos a exercício por 7 dias. Inicialmente, os animais dos grupos I, R3, R7, T3 e T7, foram submetidos a um período de 7 dias de imobilização do membro traseiro. A atrofia muscular foi confirmada após uma comparação estatística direta dos valores da área de secção transversal (AST) das fibras dos músculos estudados nos animais dos grupos I e C, sacrificados imediatamente após o período de imobilização. Em seguida, os grupos T3, T7, foram submetidos a um programa de recuperação muscular com exercício aeróbio (natação) no período de 7 e 14 dias respectivamente. Os grupos C, C3 e C7 foram mantidos sem qualquer estímulo atrófico e não foram submetidos ao exercício. Ao término do experimento os animais foram sacrificados e o músculo sóleo removido. A avaliação quantitativa da expressão gênica da MyoD e Miogenina foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR). A detecção das proteínas MyoD, Miogenina e Pax-7, com contagem dos núcleos marcados, foram analisadas por Imunofluorescência. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

Abstract

Recent research advances in understanding the cellular and molecular mechanisms that underlie the processes of hypertrophy and atrophy. This may contribute to development of effective therapeutic strategies to attenuate or block the loss of muscle tissue associated with aging and pathological conditions. In this context, myogenic factors that control the activity of satellite cells have been studied to better understand the events involved in the recovery of muscle mass. Among them, we highlight the Myogenic Regulatory Factors (MRFs), which have been described as potential mediators of muscle growth. The objectives of this study evaluated the morphofunctional adaptations and gene expression of MRFs (MyoD and myogenin) in skeletal muscle (soleus) subjected to an atrophic stimulus followed by physical training. It was used 64 male Wistar rats (80 days, 250 to 300 g), divided into 8 groups (n = 8): C: control animals a week, I: Animals immobilized a week, C3: control animals 3 days; R3: Animals immobilized and recovered for 3 days, T3: Animals immobilized and submitted to exercise for 3 days; C7: Animals controls 7 days; R7: Animals immobilized and subsequently recovered by 7 days, T7: Animals immobilized and subsequently subjected to exercise for 7 days. Initially, the animals in groups I, R3, R7, T3 and T7, were submitted to 7 days of immobilization of the hind limb. Muscle atrophy was confirmed after a direct statistical comparison of the values of cross-sectional area (CSA) of muscle fibers studied in animals in groups I and C, sacrificed immediately after the immobilization period. Then, the groups T3 and T7 were submitted a rehabilitation program with muscle aerobic exercise (swimming) for 3 and 7 days respectively. The groups C, C3 and C7 were kept without stimulus atrophic and were not subjected to exercise. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and the soleus muscle removed. The quantitative analysis of gene expression of MyoD and myogenin were performed by Real-Time Polymerase Chain Reaction after Reverse Transcription (RT-qPCR). The detection of the proteins MyoD, myogenin and Pax-7, with counting of labeled nuclei were analyzed by immunofluorescence. The data were analyzed statistically.

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é um tecido complexo, versátil e heterogêneo, constituído por células multinucleadas especializadas, as fibras musculares. As características genéticas, morfofisiológicas e bioquímicas distintas dos diferentes tipos de fibras musculares conferem ao tecido muscular uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional (Schiaffino e Reggiani, 1994; Pette e Staron, 2000).

As fibras musculares são constituídas por estruturas repetidas, os sarcômeros, unidade contrátil fundamental da fibra muscular. Cada sarcômero é formado por várias proteínas, as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero. A contração muscular ocorre por meio da interação entre os filamentos finos (actina) e os filamentos grossos (porção globular da molécula de miosina) do sarcômero (Huxley, 1971), após a hidrólise do ATP, pela miosina ATPase (mATPase) (Lowey *et al.*, 1969).

Segundo Talmadge e Roy (1993), a velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional à atividade da mATPase, na porção globular da miosina. Este evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da cadeia pesada da miosina, do inglês myosin heavy chain (MHC) (Barany, 1967; Pette e Staron, 2000). Neste contexto, Pette e Staron (2001), utilizando-se da reação histoquímica para a ATPase miofibrilar, da Imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos para isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) e da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta (slow fibers): tipo I, expressando MHCI e fibras de contração rápida (fast fibers): tipo II, subdivididas em tipo IIA (MHCIIa), tipo IID (MHCIIId) e tipo IIB

(MHCI**IIb**). Os autores classificaram estas fibras como puras, uma vez que expressavam uma única isoforma de MHC.

Além das fibras puras, existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de MHC. Estas fibras foram classificadas em Tipo IC (MHCI > MHCIIa), tipo IIC (MHCIIa > MHCI), tipo IIAD (MHCIIa > MHCIId), tipo IIDA (MHCIId > MHCIIa), tipo IIDB (MHCIId > MHCIIb) e tipo IIBD (MHCIIb > MHCIId) (Pette e Staron, 2000; Pette e Staron, 2001). Deste modo, assume-se uma organização sequencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas ($I \leftrightarrow IC \leftrightarrow IIC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAD \leftrightarrow IID \leftrightarrow IIDB \leftrightarrow IIB$) (Pette e Staron, 2000).

O músculo esquelético é um tecido altamente plástico. Em resposta a estímulos que modifiquem a atividade contrátil (exercício aeróbio, estimulação elétrica, desnervação e envelhecimento), a carga no músculo (exercício resistido e microgravidade) e o fornecimento de substrato (intervenção nutricional) (Pette e Staron, 2000; Magaúda *et al.*, 2004), o músculo é capaz de alterar suas características morfológicas, estruturais e fenotípicas para suprir as demandas metabólicas e funcionais. Uma das principais características da plasticidade muscular é a regulação intrínseca da transcrição de genes envolvidos com a síntese protéica (promovendo um aumento da massa muscular) ou com a degradação protéica (promovendo a atrofia muscular) (Matsakas *et al.*, 2005; Baar *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que situações de desuso decorrente de modelos experimentais (imobilização, suspensão do membro posterior, desnervação, repouso no leito e tenotomia) ou processos fisiológicos (envelhecimento) e patológicos (câncer, doenças neuromusculares, insuficiência respiratória e sepsia) podem conduzir a severa perda da massa muscular (Machida e Booth, 2004). Por outro lado, tem sido demonstrado que alguns programas de treinamento podem modular o grau de síntese e

degradação das proteínas miofibrilares e, potencialmente, promover a recuperação da massa muscular (Campos *et al.*, 2002; Kadi *et al.*, 2000).

Estes treinamentos podem gerar sobrecarga progressiva no tecido muscular e, potencialmente, promover microlesões nas fibras musculares, comumente denominadas miotrauma adaptativo (MA). O MA tem sido descrito como um fator essencial para iniciar o processo de hipertrofia muscular, por meio da ativação das células satélites (CS). As CS são precursores miogênicos indiferenciados que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, para a regeneração das fibras musculares danificadas e manutenção do músculo esquelético adulto (Bischoff, 1994; Hawke e Garry, 2001; Chargé e Rudnicki, 2004).

Neste sentido, o treinamento resistido tem sido divulgado como um potente estímulo, capaz de promover a hipertrofia, força e potência muscular, além de induzir à modulação dos tipos de fibras e das isoformas de MHC do tipo MHCI**ib** para MHCI**IIa** (Campos *et al.*, 2002; Bickel *et al.*, 2005). Por outro lado, o treinamento aeróbio conduz a pequenas mudanças na massa muscular, entretanto, promove o aumento do número de mitocôndrias, da atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (Hawley, 2002) e da captação de oxigênio em exercício submáximo (Trappe *et al.*, 2006).

Embora estas adaptações musculares ao exercício físico estejam bem descritas, os mecanismos intracelulares envolvidos com estes ajustes e/ou adaptações em resposta ao exercício não estão bem esclarecidos. A magnitude e especificidade das mudanças no perfil fenotípico muscular aos diversos modelos e protocolos de exercício/treinamento físico, são dependentes de alterações na expressão de genes músculo-específicos, controlados pela ativação e/ou repressão das vias intracelulares envolvidas com a ativação de fatores transcricionais que levam à expressão de genes musculares.

Dentre os fatores transcricionais, destacam-se os fatores de regulação miogênica (MRFs), proteínas que pertencem à família dos fatores transcricionais “*basic helix-loop-helix*” (BHLH), da qual fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 (Seale e Rudnicki, 2000). Essas proteínas contêm um domínio altamente conservado necessário para a ligação com proteínas E, como E12 e E47. Os MRF-proteína E ligam-se a sequências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos (Murre *et al.*, 1989), levando à expressão dos mesmos (Davis *et al.*, 1990).

No contexto do exercício físico, vários estudos relatam alterações na expressão dos MRFs apontando estas proteínas como importantes mediadoras da hipertrofia e metabolismo musculares (Mozdziak *et al.*, 1998; Goldspink, 1999; Lowe e Alway, 1999; Hameed *et al.*, 2003). Em adição, Psilander *et al.* (2003) demonstraram no músculo vasto lateral de humanos, que uma única série de exercício de resistência aumenta a expressão da MyoD e miogenina.

Durante o processo da miogênese, os MRFs controlam a ativação, proliferação e diferenciação de células da linhagem miogênica. As fases de ativação e proliferação das CS são caracterizadas pela alta expressão de MyoD e Myf5, enquanto na diferenciação ocorre um aumento na expressão de Miogenina e MRF4 (Zammit *et al.*, 2006). Juntos, os MRFs são comumente utilizados como marcadores das fases de proliferação e diferenciação das CS durante o processo de hipertrofia muscular.

Como as CS estão diretamente envolvidas com a manutenção da massa muscular e são influenciadas pelos MRFs, a hipótese do nosso estudo é que as respostas morfológicas que ocorrem no músculo esquelético de ratos submetidos ao treinamento físico, após estímulo atrófico estão associadas com alterações na expressão dos MRFs.

2. OBJETIVO

Avaliar as adaptações morfofuncionais e a expressão gênica dos MRFs (MyoD e Miogenina), em músculo esquelético de ratos submetidos a treinamento físico após estímulo atrófico.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais e Protocolo Experimental

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IB), UNESP. Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos (80 dias, 250 a 300 g), provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em ambiente com temperatura controlada (22-24 °C) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12 h). Os animais foram providos com ração e água *ad libitum*. Este experimento foi submetido ao Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Os animais foram aleatoriamente divididos em 8 grupos experimentais, com 8 animais em cada grupo:

- C: animais controle 1ª semana (submetido a 7 dias de experimento, sem estímulo atrófico).
- I: animais imobilizados 1ª semana (submetido a 7 dias de estímulo atrófico)
- C3: animais controle 3 dias (submetido a 10 dias de experimento, sem estímulo atrófico e não submetido a exercício).
- R3: animais imobilizados e recuperados por 3 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrófico e 3 dias de recuperação espontânea, sem exercício físico)

- T3: animais imobilizados e submetidos a exercício por 3 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrófico e recuperação de 3 dias com exercício aeróbio)
- C7: animais controle 7 dias (submetido a 14 dias de experimento, sem estímulo atrófico e não submetido a exercício).
- R7: animais imobilizados e recuperados por 7 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrófico e 7 dias de recuperação espontânea, sem exercício físico)
- T7: animais imobilizados e submetidos a exercício por 7 dias (submetido a 7 dias de estímulo atrófico e recuperação de 7 dias com exercício aeróbio)

3.2. Imobilização dos membros traseiros

Inicialmente, os animais dos grupos I, R3, R7, T3 e T7 foram anestesiados com Ketamina (50 mg/kg, i.p) e cloridrato de Xilazina (10 mg/kg, i.p), a fim de garantir a completa sedação dos animais durante a efetivação da imobilização. Em seguida, o segmento posterior dos animais foi imobilizado (Figura 1) com atadura gessada de secagem rápida. A abrangência da imobilização foi do quadril até o tornozelo, de modo que o músculo sóleo permaneça em posição neutra. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram imobilizados durante 7 dias, para promover significativa perda de massa muscular (Appell, 1986; Silva *et al.*, 2006). Os animais do grupo C, C3 e C7 foram utilizados como controle e mantidos em gaiolas individuais, sem qualquer estímulo atrófico. A atrofia muscular foi confirmada após uma comparação estatística direta dos valores da área de secção transversal (AST) das fibras musculares dos animais dos grupos I e C, sacrificados imediatamente após este período.

Após o período de imobilização, os animais do grupo R1 e R2 foram mantidos em gaiolas e não foram submetidos a um programa de recuperação, enquanto os animais dos grupos T3 e T7 foram submetidos a exercício aeróbio de natação. Todos os animais

do experimento foram adaptados ao treinamento de natação para minimizar os efeitos do estresse proporcionado pelos exercícios. Todos os animais dos grupos C, C3 e C7 foram mantidos em água rasa durante todo o período de treinamento.



Figura 1. Imagem representativa da Imobilização dos membros inferiores dos animais dos grupos Imobilizado (I), Recuperado 3 e 7 dias (R3 e R7) e Treinados 3 e 7 dias (T3 e T7).

3.3. Protocolo do treinamento aeróbio

O treinamento aeróbio foi realizado em um aquário subdividido em compartimentos individualizados, contendo água a 28-30°C e 50 cm de profundidade (Figura 2). O volume (tempo) e intensidade (sobrecarga) de treinamento foram de 20 min com 3 % do peso corporal, 5 dias por semana, durante as duas semanas de treinamento. As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.

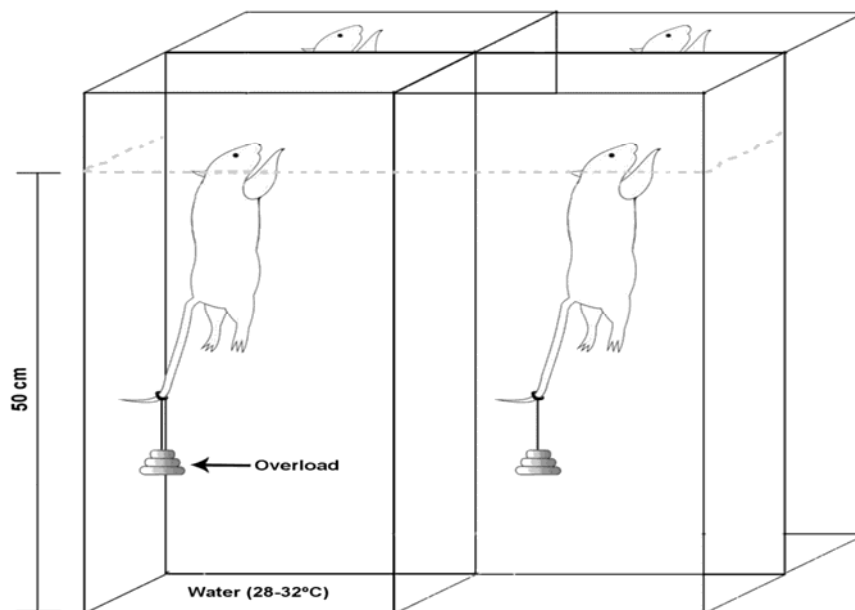


Figura 2. Imagem representativa do treinamento aeróbico com carga dos animais dos grupos T3 e T7.

3.4. Dados Anatômicos

Durante todo o período de experimento foram monitorados, diariamente, o peso corporal e o consumo de ração dos animais. Ao término do experimento, os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. A seguir, o músculo sóleo (SOL) foi coletado e pesado. A relação entre o peso do músculo (PM) e peso corporal (PC) dos animais (PM/PC) foi utilizada como índice de atrofia ou hipertrofia das fibras musculares.

3.5. Análise Morfológica e Área de secção transversal (AST) das fibras musculares

Após a retirada do músculo, uma porção foi imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido (-156 °C) e armazenada em freezer a -80 °C. Cortes histológicos (12 µm) foram obtidos em um criostato a -20 °C. Foi realizada a

coloração por hematoxilina e eosina (HE) para a análise da morfologia geral das fibras musculares.

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin) foi mensurada a AST de aproximadamente 200 fibras (2 campos aleatórios de cada músculo) de cada animal.

3.6. Imunofluorescência para MyoD, Miogenina e Pax-7

A técnica da imunofluorescência foi utilizada para detectar a presença de MyoD (indicando as células miosatélites em proliferação), Miogenina (células miosatélites em fase de diferenciação) e Pax-7 (células miosatélites quiescentes). A detecção da fluorescência foi feita em microscópio de fluorescência com software de análise de imagens apropriado e os núcleos marcados foram contados em relação ao número de miofibras por campo. Cortes das amostras musculares previamente congeladas foram obtidos em criostato a -20 °C. Os cortes foram fixados em PFA 4% (paraformaldeído) durante 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*) e incubadas com BSA 4% (Albumina Sérica Bovina) + soro de cabra 5% + Triton 0,01% em PBS por 3 horas em temperatura ambiente para bloqueio das ligações inespecíficas. Em seguida, incubadas *overnight* com os respectivos anticorpos primários (Tabela 1) em câmara úmida a 4°C. Após incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com Triton 0,01% em PBS e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Tabela 1), conjugados com fluorocromos específicos, por 90 min em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com Triton 0,01% em PBS para total remoção dos anticorpos que não se ligaram. Finalmente, as lâminas foram finalizadas com meio de

montagem UltraCruz™ Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA), onde foram contra-coradas com DAPI para identificação dos núcleos totais.

Tabela 1. Anticorpos a serem utilizados para a reação de Imunofluorescência

Proteína	Anticorpo Primário/Código	Anticorpo Secundário/Código	Fabricante
MyoD	MyoD (M-318) / C-760	donkey anti-rabbit IgG-FITC /C-2090	Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA
Miogenina	Myogenin (M-225) / C-576	mouse anti-rabbit IgG-R /C-2492	
Pax-7	PAX7 / C-81648	goat anti-mouse IgG-TR / C-2781	

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; R: Rodamina; PE: Ficoeritrina; TR: Texas Red®

3.7. Avaliação da expressão dos RNA mensageiros (mRNAs) alvo

A expressão dos mRNAs foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR), seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (Bustin, 2009).

3.7.1. Extração e análise da qualidade do RNA

Para a amplificação dos microRNAs e dos mRNAs alvo, a extração do RNA foi realizada com os kits *mirVana* (Ambion, EUA) e *TRIzol* (Life Technologies, EUA), respectivamente, segundo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com *TURBO DNase* (Ambion, EUA) para remover a contaminação com DNA genômico. A concentração de RNA, em ng/μL, foi determinada por meio do espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-Vis* (Nanodrop Technologies, EUA). A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA).

3.7.2. Reação de Transcrição Reversa dos mRNAs

A transcrição reversa dos mRNAs obtidos foi realizada utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Esse kit é responsável pela produção de cDNA de alta qualidade e precisão. Para a reação foram utilizados 4 µL de *Master Mix* para a transcrição reversa ao qual foi adicionado 2 µg de RNA e o volume completado para 20 µL com água livre de nucleases. A mistura foi incubada nas seguintes condições: 25 °C por 5 min, 42 °C por 30 min seguidos da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min.

3.7.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (mRNA)

A PCR em Tempo Real (mRNA) foi realizada com o *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA) utilizando-se 2 µL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de *Power SYBR[®] Green Mix* (2,5 x) e 400 Nm de cada primer, em um volume final de 25 µL. Os primers para os genes analisados foram obtidos através do software *Primer Express* (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA) (Tabela 2), a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) e sintetizados pela *Life Technologies Coporation* (Carlsbad, CA, EUA). As reações para cada gene foram realizadas em duplicata, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Life Technologies Coporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme recomendações do fabricante. Foram analisados por meio do software *Genorm* 4 genes constitutivos, dos quais os mais estáveis foram utilizados como genes de referência. O fator de normalização gerado pelo software foi utilizado para normalizar os dados de expressão dos genes alvo.

Nesse estudo, a estabilidade dos genes de referência B2M, PpiA e PpiB foi testada utilizando-se o software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002). Esse software,

que funciona como um aplicativo do Microsoft Excel, determina os genes de referência mais estáveis dentre um conjunto de genes testados, para uma mesma amostra de cDNA. Os dados que devem ser inseridos no software correspondem aos valores de Ct, obtidos na RT-qPCR para os genes de referência testados, transformados em um valor equivalente de quantidade, através da fórmula $2^{(Ct \text{ amostra} - \text{menor valor de Ct})}$. A partir desses valores, o geNorm calcula o índice de estabilidade M para cada gene de referência, de forma que quanto maior o valor de M, menor a estabilidade do gene de referência. O usuário exclui o M de maior valor, repetindo esse passo até que restem, pelo menos, os dois genes de referência mais estáveis. A partir desse resultado, o programa calcula um fator de normalização (FN) a partir da média geométrica das quantidades dos genes de referência mais estáveis.

Tabela 2. Genes que foram analisados pela reação de RT-qPCR

Genes	Nº de Acesso
MyoD	NM_176079
Miogenina	NM_017115
Nº Acesso: número de acesso às seqüências publicadas no GenBank.	

3.8. Análise Estatística

Para a análise estatística dos valores da expressão gênica e dos dados anatômicos e morfométricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para o modelo com 2 fatores (Zar, 1999), seguido por teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

Para a análise estatística dos dados da imunofluorescência, foram utilizados testes não paramétricos: teste de Mann-Whitney quando comparados os grupos C e I e

teste de Kruskal-Wallis quando comparados os grupos C3, R3 e T3 ou C7, R7 e T7 (Zar, 1999). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Peso corporal (PC), peso do músculo e consumo alimentar*

Ao longo do experimento, a oferta de ração foi controlada para todos os grupos experimentais, a fim de estabelecer um padrão no consumo alimentar dos animais. Desta forma, não obtivemos uma diferença significativa no consumo de ração dos ratos, entre os grupos. Assim, não houve uma diferença significativa no peso corporal inicial (PCI) e no peso corporal final (PCF) dos ratos entre os grupos experimentais (Figuras 3, 4, 5 e 6).

Entretanto, o processo de imobilização promoveu uma redução significativa na relação peso do músculo sóleo pelo comprimento da tíbia (Rel Psóleo/Ctúbia) (Figuras 7 e 10 e Tabela 3) no grupo imobilizado (I) em relação ao grupo controle (C), nos permitindo concluir que houve uma atrofia das fibras musculares.

Os grupos submetidos a 3 dias de recuperação, após atrofia, obtiveram uma diferença significativa na Rel Psóleo/Ctúbia dos animais inseridos no grupo submetido à recuperação espontânea (R3) e no grupo submetido ao treinamento aeróbio de natação (T3) comparados ao grupo controle 3 dias (C3) (Figuras 8 e 11 e Tabela 3). Estes dados nos permitem inferir que apenas 3 dias de recuperação espontânea e de treinamento aeróbio de natação não foram suficientes para a recuperação do peso do músculo em ambos os grupos.

Quanto aos grupos submetidos a 7 dias de recuperação, a Rel Psóleo/Ctúbia dos animais pertencentes ao grupo de recuperação espontânea (R7) foi estatisticamente diferente em relação aos animais do grupo controle 7 dias (C7), enquanto que os

animais do grupo submetido ao treinamento aeróbio de natação (T7) não obtiveram uma diferença significativa na Rel Psóleo/Ctúbia quando comparado aos animais do grupo controle 7 dias (C7) (Figuras 9 e 12 e Tabela 3). Estes resultados indicam que a recuperação espontânea por 7 dias não favoreceu o restabelecimento do peso do músculo em estudo, entretanto, o treinamento físico de natação por 7 dias auxiliou na recuperação da atrofia.

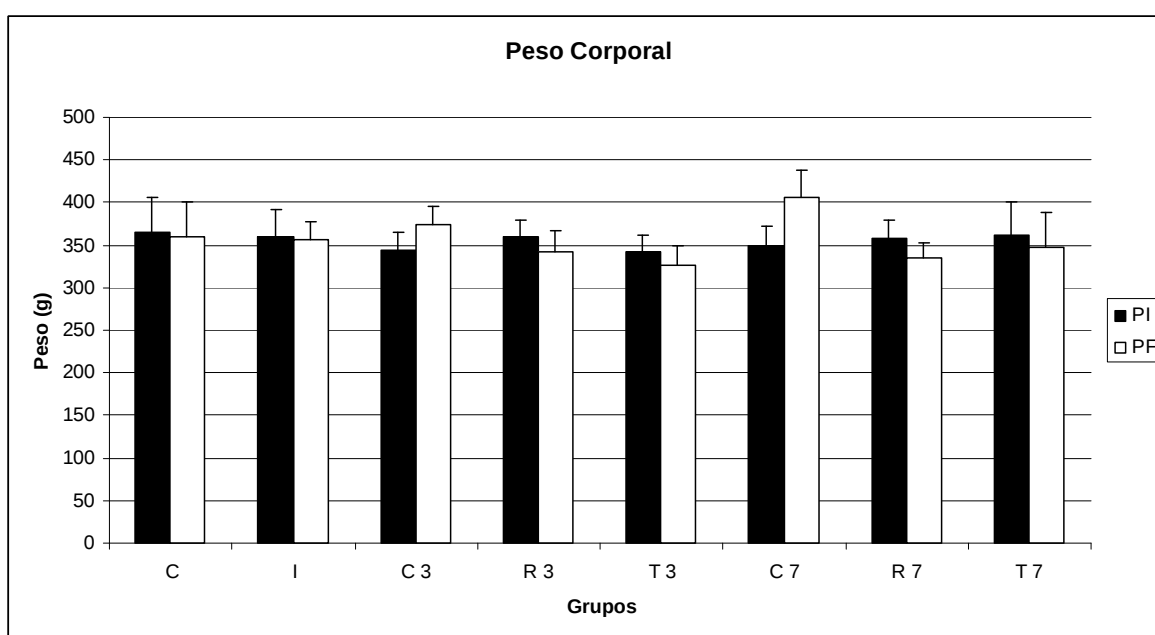


Figura 3. Peso corporal inicial (PCI) e final (PCF) dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle (C), imobilizado (I), controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3), treinado 3 dias (T3), controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7).

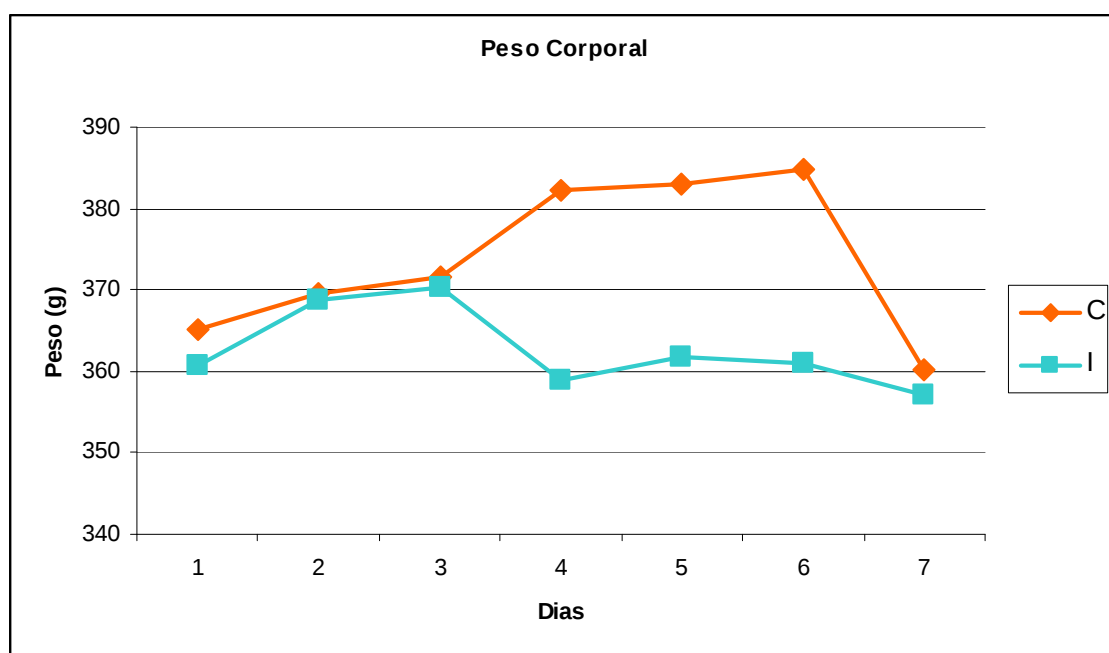


Figura 4. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle (C) e imobilizado (I) durante o experimento. Valores expressos em média $\pm$ DP.

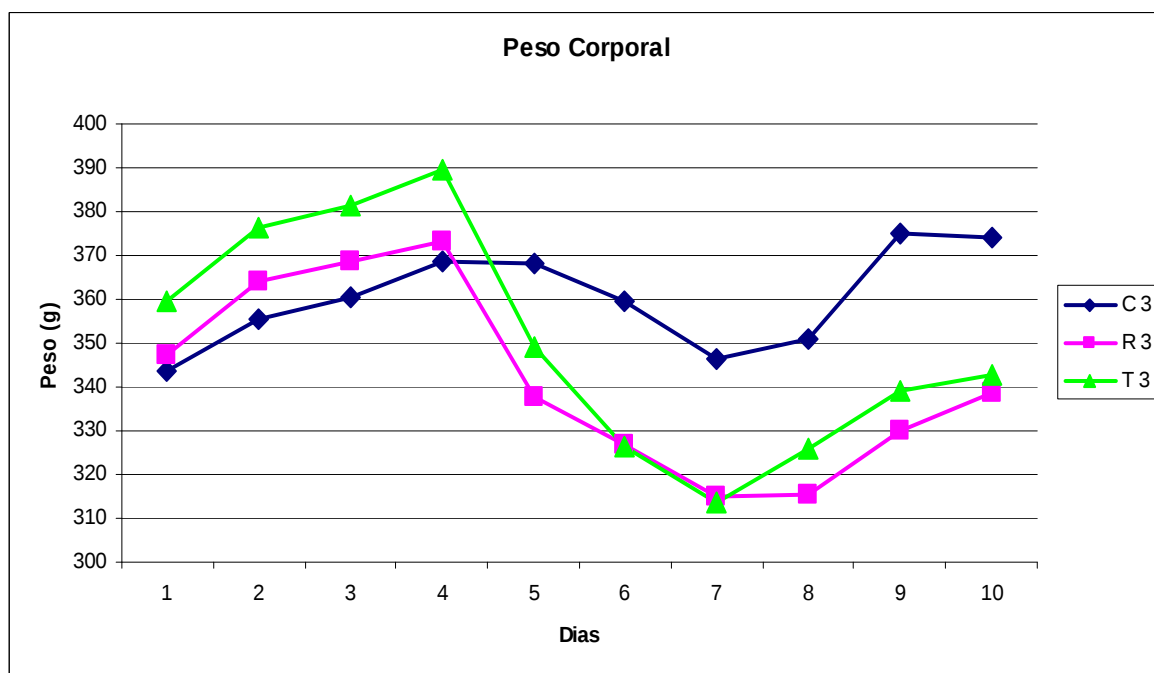


Figura 5. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3) e treinado 3 dias (T3) durante o experimento. Valores expressos em média $\pm$ DP.

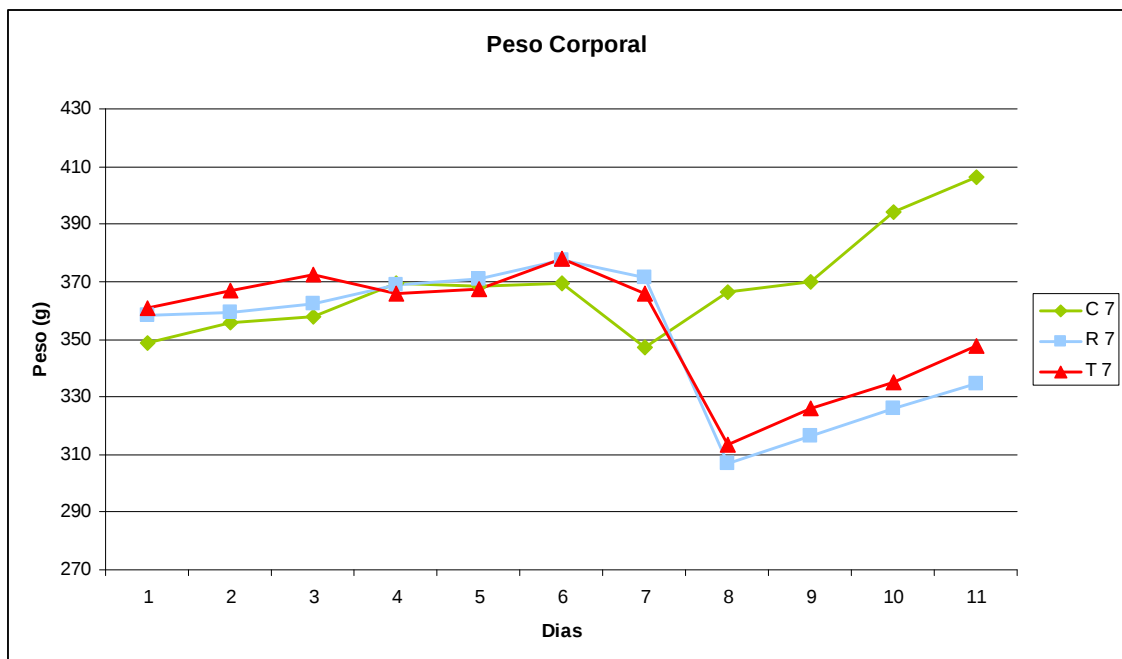


Figura 6. Peso corporal dos grupos experimentais (n=8 por grupo): controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7). Valores expressos em média $\pm$ DP.

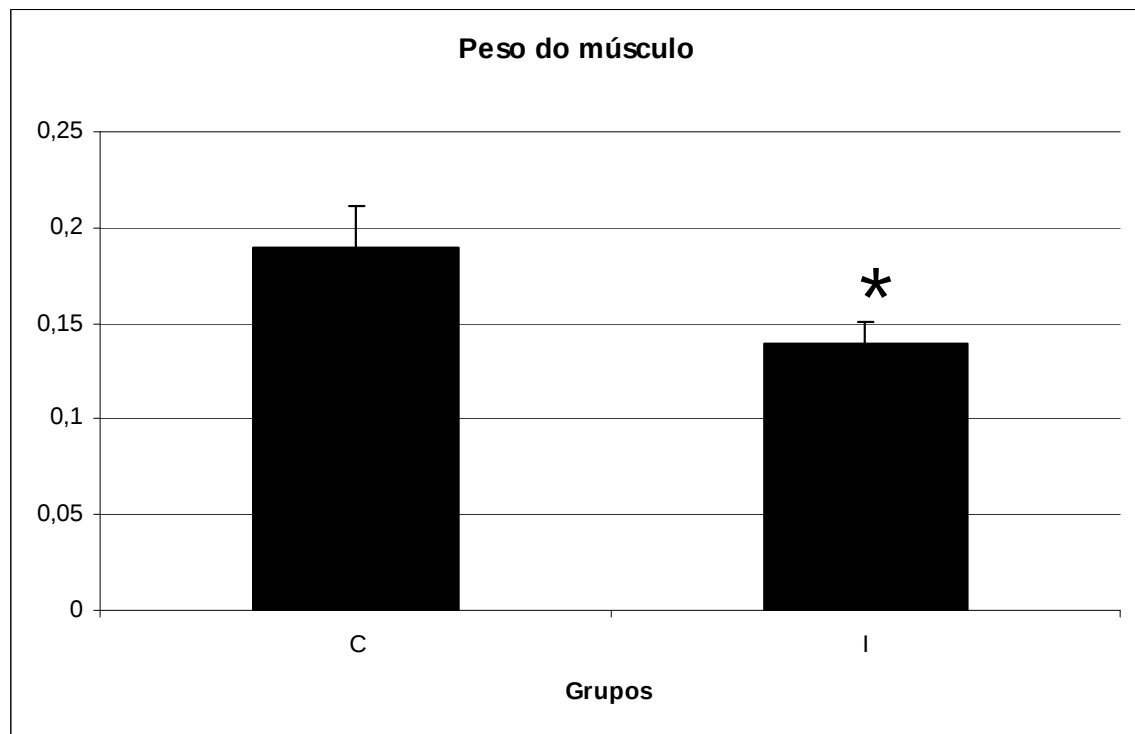


Figura 7. Peso do músculo sóleo entre os grupos C e I. Valores expressos em média ± DP. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo C.

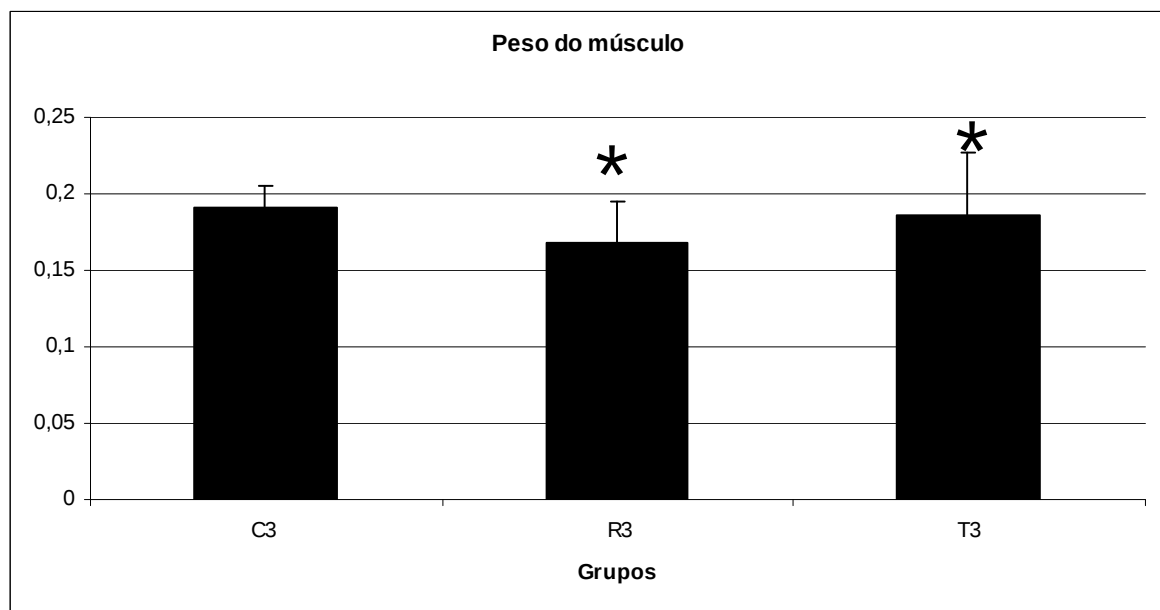


Figura 8. Peso do músculo sóleo entre os grupos C3, R3 e T3. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C3.

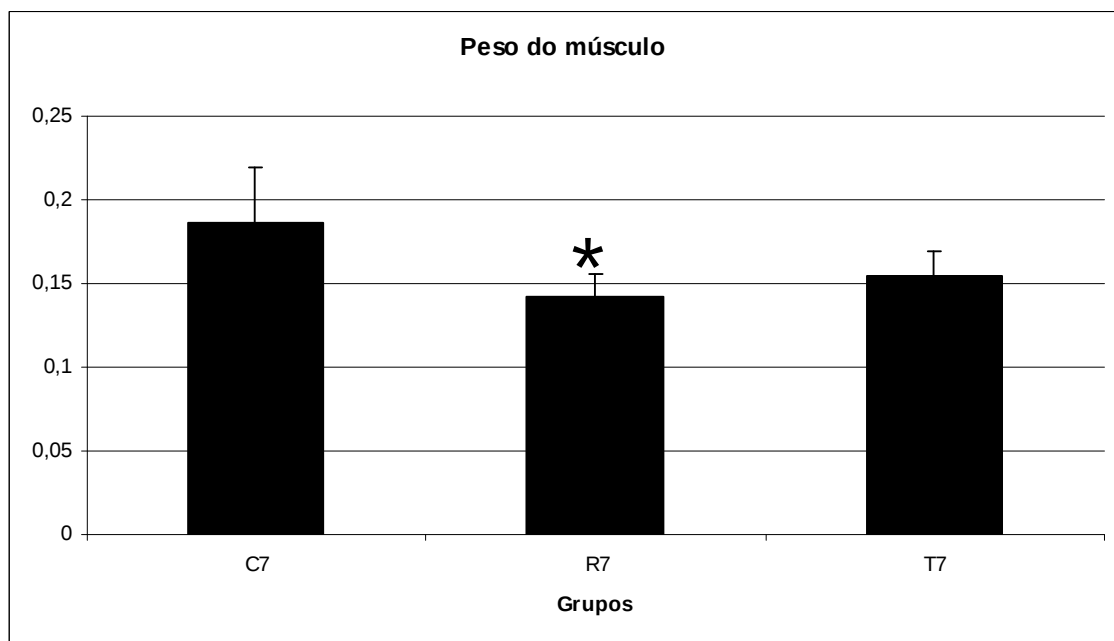


Figura 9. Peso do músculo sóleo entre os grupos C7, R7 e T7. Valores expressos em média ± DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C7.

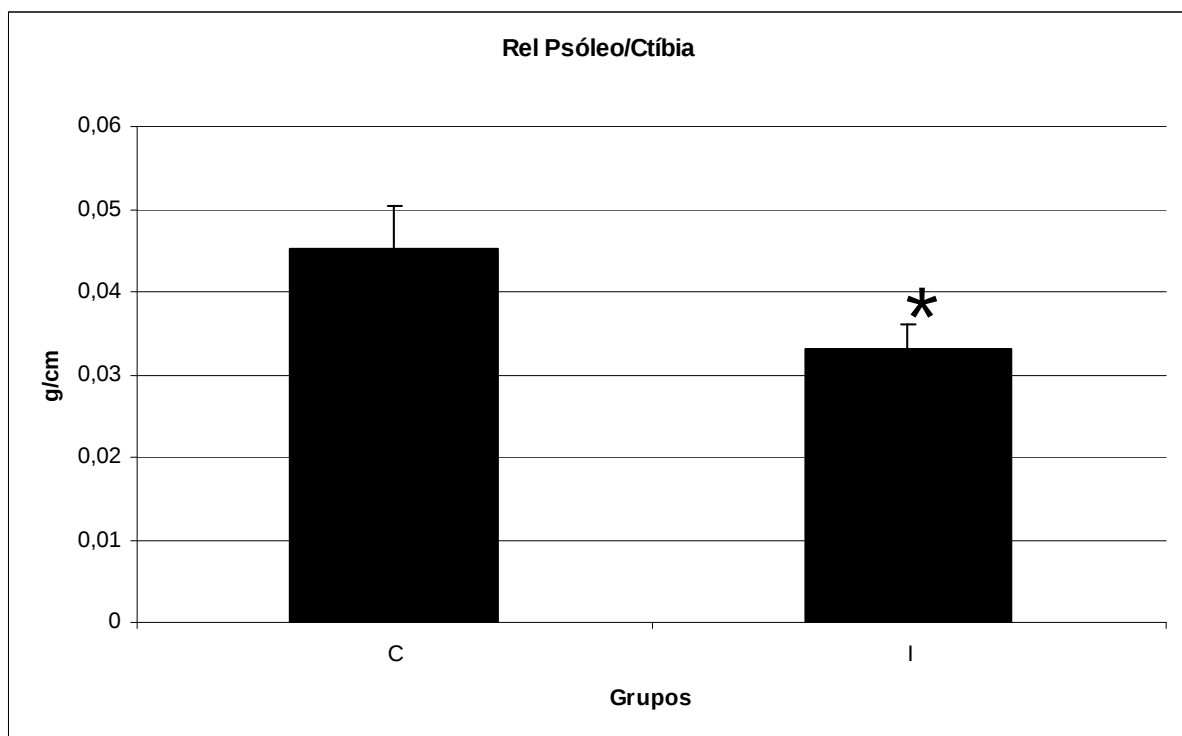


Figura 10. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C e I.

Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,0001$ em relação ao grupo C.

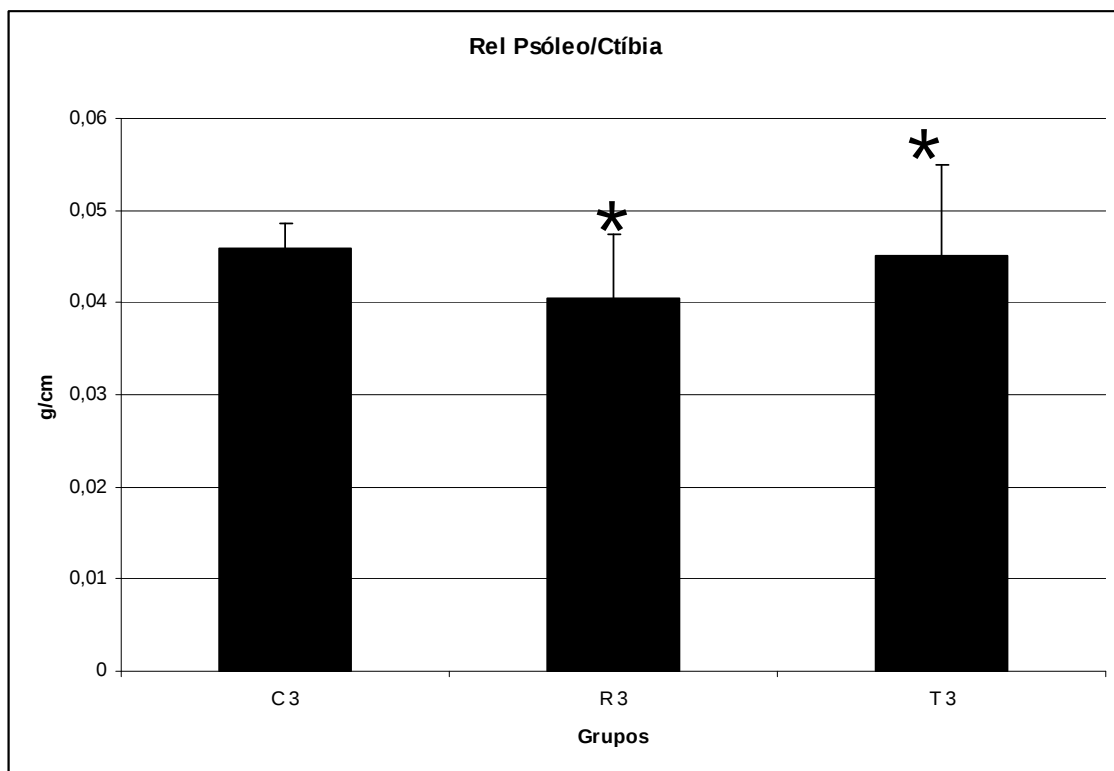


Figura 11. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C3, R3 e T3. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C3.

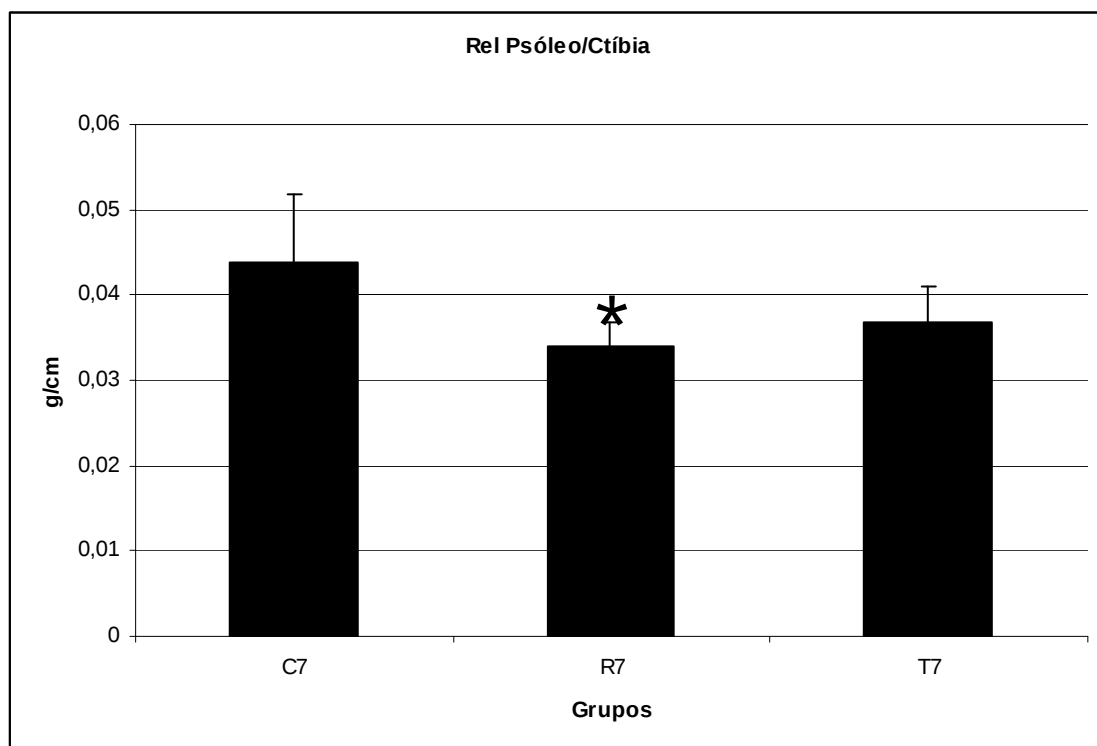


Figura 12. Relação Peso do sóleo pelo Comprimento da tíbia entre os grupos C7, R7 e T7. Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao grupo C7.

Tabela 3. Peso dos músculos Sóleo (So) e relação peso do músculo/comprimento da tíbia (Rel So/Ct). Valores expressos em média $\pm$ DP.		
Grupos	So (mg)	Rel So/Ct (mg/cm)
C (n=8)	189,50	45,12
I (n=8)	138,75	33,04
C3 (n=8)	190,93	45,94
T3 (n=8)	186,11	45,06
R3 (n=8)	167,43	40,49
C7 (n=8)	186,00	43,85
T7 (n=8)	142,12	34,02
R7 (n=8)	154,43	36,70

4.2. Análise morfológica

A análise dos cortes histológicos, corados com HE, das amostras do músculo sóleo de todos os animais dos grupos em estudo, mostrou fibras musculares de formato arredondado ou poligonal e núcleos periféricos, separadas por finos septos de tecido conjuntivo frouxo, o endomísio, e septos mais espessos de tecido conjuntivo denso, o perimísio, separando as fibras musculares em fascículos (Figura 13).

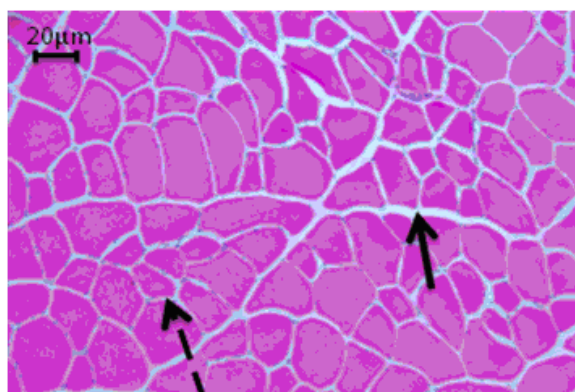


Figura 13. Corte transversal do músculo sóleo de um animal representativo do grupo controle. Coloração HE. Fibra muscular (acidófilas), perimísio (seta contínua) e endomísio (seta descontínua). Barra 20μm. do grupo controle 1ª semana. Coloração HE.

Porém, quando cortes histológicos dos grupos C e I foram submetidos à mensuração da área de secção transversal (AST), obtivemos uma redução significativa do grupo I em relação ao grupo C ($p=0,019$) (Figura 14), mostrando que o protocolo de imobilização levou à atrofia das fibras musculares.

Os grupos submetidos a 3 dias de recuperação após atrofia, obtiveram uma diferença significativa na AST do grupo R3 quando comparado ao grupo C3, enquanto o grupo T3 não apresentou uma diferença significativa na AST do músculo sóleo quando comparado a grupo C3 ($p=0,0068$), revelando que o protocolo de treinamento aeróbio de 3 dias foi o suficiente para o restabelecimento das fibras musculares (Figura 15).

Nos grupos submetidos a 7 dias de recuperação após atrofia, a AST apresentou uma redução estatisticamente significativa do grupo R7 em relação aos animais do grupo C7, enquanto que os animais do grupo T7 não apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,0001$), revelando que 7 dias de recuperação espontânea ainda não exerceram estímulos suficientes para a restauração das fibras musculares, enquanto que 7 dias de treinamento aeróbio de natação foram suficientes para seu restabelecimento (Figura 16).

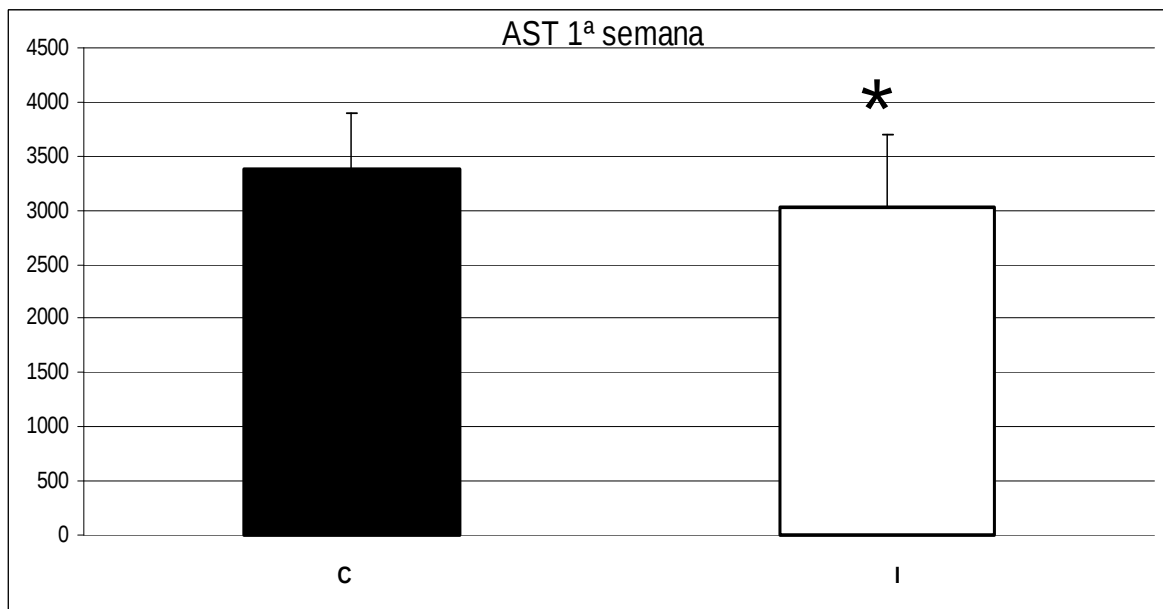


Figura 14. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle (C) e imobilizado (I). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo I.

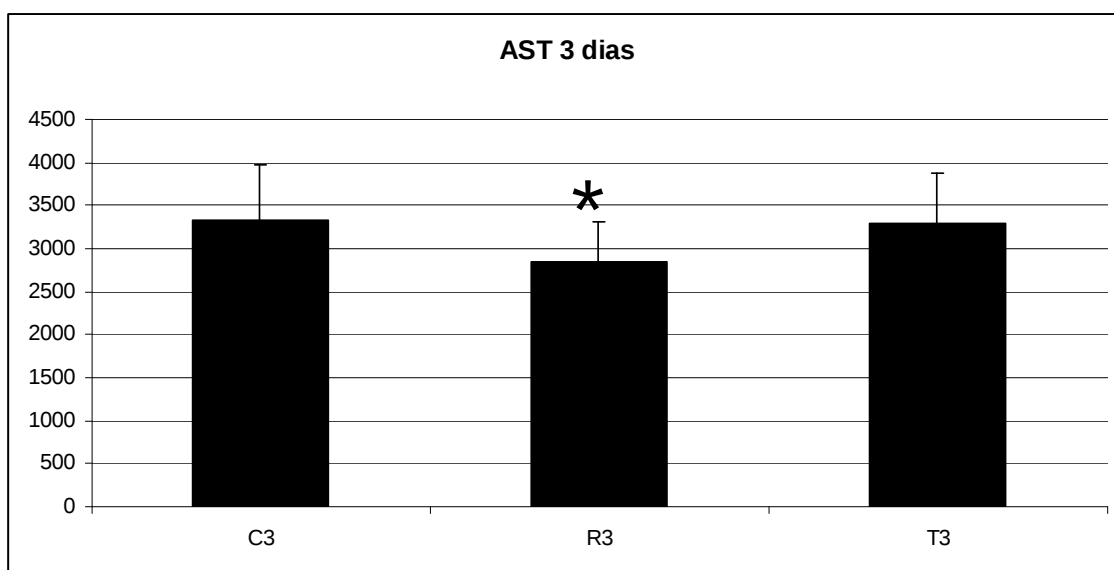


Figura 15. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle 3 dias (C3), recuperado 3 dias (R3) e treinado 3 dias (T3). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo C3.

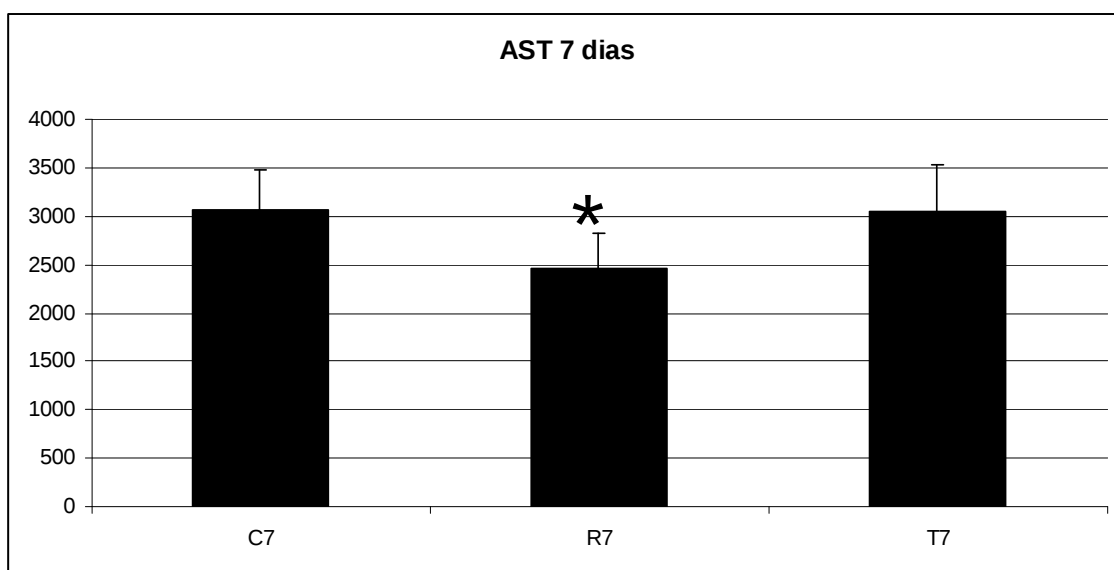


Figura 16. Área de secção transversal (AST) do músculo sóleo (n=8 por grupo): controle 7 dias (C7), recuperado 7 dias (R7) e treinado 7 dias (T7). Valores expressos em média $\pm$ DP. * $p < 0,03$ em relação ao grupo C7.

4.3. Imunofluorescência para Miogenina, MyoD e Pax 7

Não foi observada alteração no número de células satélites Pax 7+, MyoD+ e Miogenina+ entre os grupos analisados (Quadros 1, 2 e 3). As figuras 17, 18 e 19 mostram imagens das reações realizadas.

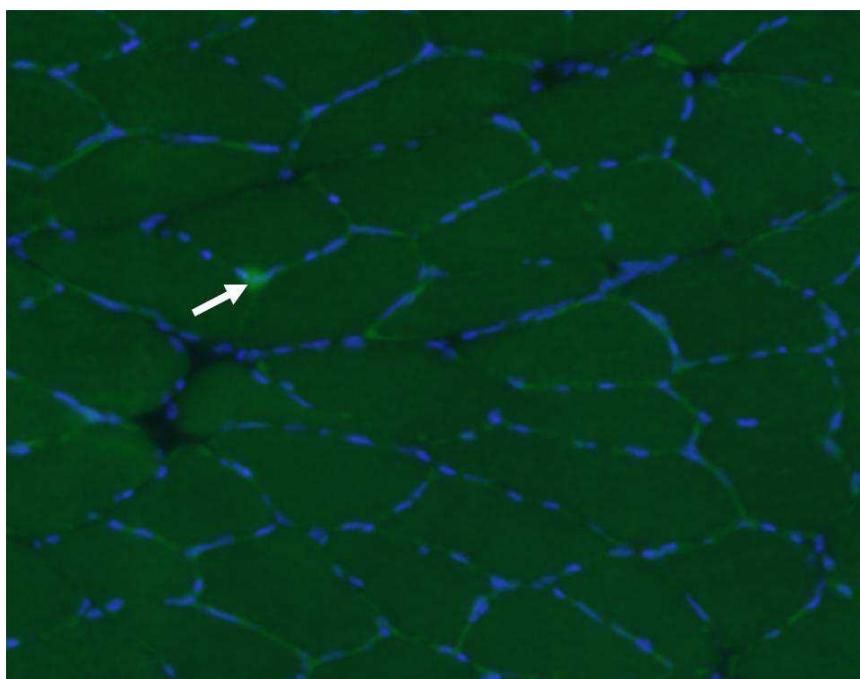


Figura 17. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites Miogenina+. Núcleos das fibras musculares corados com DAPI (azul) e células satélites indicadas por setas.

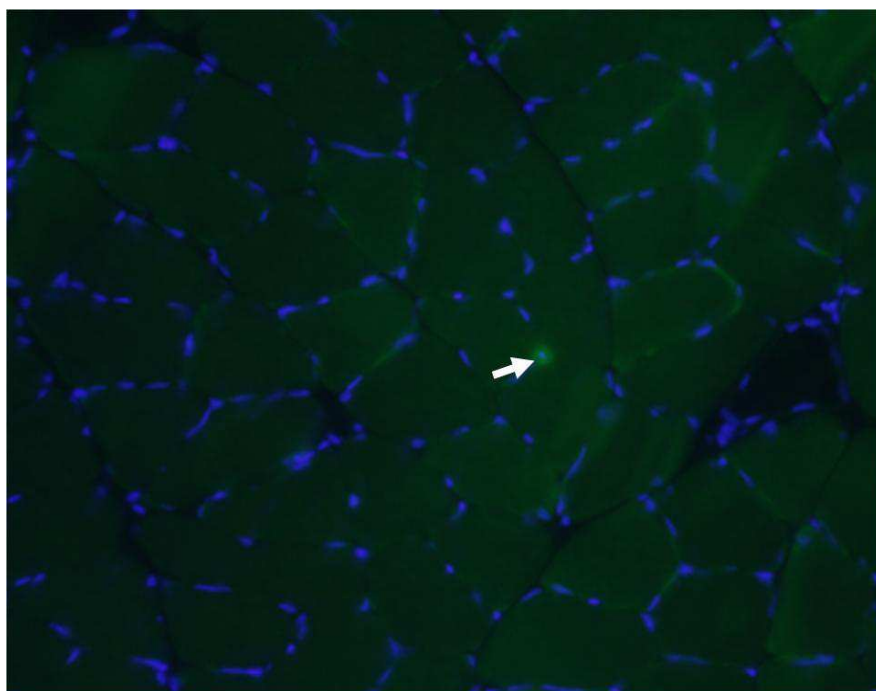


Figura 18. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites Pax7+. Núcleos das fibras musculares corados com DAPI (azul) e células satélites indicadas por setas.

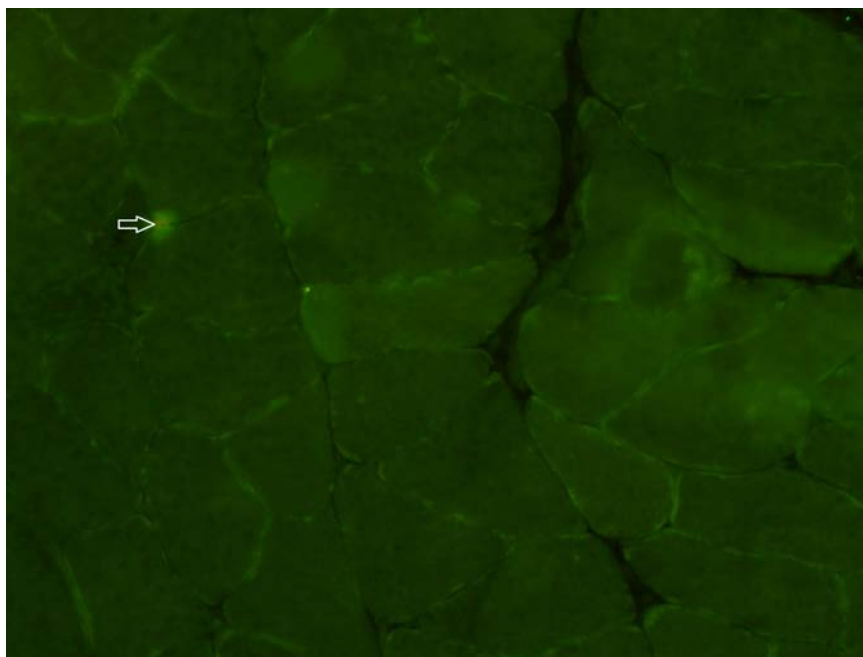


Figura 19. Imagem representativa da técnica de imunofluorescência em animais do grupo C. Marcação para células satélites MyoD+. Células satélites indicadas por setas.

Quadro 1. Média das miofibras e das células satélites Pax 7+ e razão entre as médias dos grupos.			
Pax 7			
	<i>Miofibras</i>	<i>Células Satélites</i>	<i>Razão</i>
C	115,92	2,75	0,0241
I	135,23	3,97	0,0350
C3	118,6	2,76	0,0241
R3	133,92	3,11	0,0234
T3	107,94	3,62	0,0391
C7	130,73	2,20	0,0173
R7	136,84	2,77	0,0210
T7	112,32	3,82	0,0363

Quadro 2. Média das miofibras e das células Miogenina ⁺ e razão entre as médias dos grupos.			
Miogenina			
	<i>Miofibras</i>	<i>Células satélites</i>	<i>Razão</i>
C	112,46	2,2	0,0197
I	124,73	2,35	0,0206
C3	113,32	2,16	0,0188
R3	117,35	2,65	0,0233
T3	115,2	2,68	0,0239
C7	120,37	1,97	0,0166
R7	159,16	2,42	0,0159
T7	117,92	3,39	0,0310

Quadro 3. Média das miofibras e das células MyoD ⁺ e razão entre as médias dos grupos.			
MyoD			
	<i>Miofibras</i>	<i>Células satélites</i>	<i>Razão</i>
C	103,67	3,17	0,0306
I	109,32	3,5	0,0320
C3	112,69	1,86	0,0165
R3	121,17	2,83	0,0233
T3	100,61	3,25	0,0323
C7	115,84	2,08	0,0179
R7	126,2	2,3	0,0182
T7	107,09	4,09	0,0382

4.4. Avaliação quantitativa da expressão gênica por qRT-PCR

Os dados referentes à quantificação do RNA por espectrofotometria, a 260 nm, nos forneceram a quantidade de RNA e a razão entre 260/280 nm, as quais nos revelam a estimativa da qualidade da extração (Tabelas 4, 5 e 6). A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de razão 260/280 nm aproximadamente igual a 2,0.

Tabela 4. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle (C1 e C2) e Imobilizado (I1 e I2).

Músculo Sóleo	
Amostras	260/280
C1.1	1,964
C1.2	1,904
C1.3	1,945
C1.4	1,892
C2.1	1,908
C2.2	1,913
C2.3	1,941
C2.4	1,983
I1.1	1,932
I1.2	1,833
I1.3	1,985
I1.4	1,974
I2.1	1,921
I2.2	1,861
I2.3	1,957
I2.4	1,954

Tabela 5. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle 3 dias (C3 e C4) e Recuperado 3 dias (R1 e R2) e Treinado 3 dias (T1 e T2).

Músculo Sóleo	
Amostras	260/280
C3.1	2,004
C3.2	1,933
C3.3	1,866
C3.4	1,996
C4.1	1,980
C4.2	1,919
C4.3	1,983
C4.4	1,987
R1.1	1,907
R1.2	1,977
R1.3	1,956
R1.4	1,954
R2.1	1,934
R2.2	2,001
R2.3	1,992
R2.4	1,954
T1.1	1,834
T1.2	1,855
T1.3	1,929
T1.4	1,815
T2.1	1,905
T2.2	1,922
T2.3	1,973
T2.4	1,935

Tabela 6. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade (quantificação) do RNA total isolado do músculo sóleo nos grupos Controle 7 dias (C5 e C6) e Recuperado 7 dias (R3 e R4) e Treinado 7 dias (T3 e T4).

Músculo Sóleo	
Amostras	260/280
C5.1	1,849
C5.2	1,907
C5.3	1,879
C5.4	1,950
C6.1	1,897
C6.2	1,878
C6.3	1,915
C6.4	1,860
R3.1	1,906
R3.2	1,917
R3.3	1,987
R3.4	1,887
R4.1	1,945
R4.2	1,861
R4.3	1,947
R4.4	1,931
T3.1	1,927
T3.2	1,838
T3.3	1,964
T3.4	1,985
T4.1	1,917
T4.2	1,948
T4.3	1,933
T4.4	1,918

Após a eletroforese em gel de agarose (1%) da solução contendo o RNA total das amostras musculares, a integridade do RNA extraído foi constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S (Figura 20).

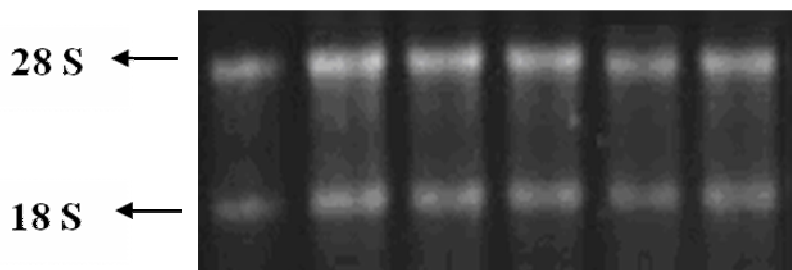


Figura 20. Gel de agarose (1%), demonstrando a qualidade do RNA extraído dos músculos Sóleo e Plantar, grupo Controle, constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Não foi observada alteração na expressão gênica da MyoD e da Miogenina no grupo I, em relação ao grupo C (Quadro 4).

Nos grupos submetidos a 3 dias de recuperação, após atrofia, foi observada uma diferença significativa na expressão gênica da MyoD e da Miogenina no grupo T3, em relação ao grupo C3 (Quadro 5). A expressão da MyoD no grupo T3 foi altamente significativa, o que demonstra sua maior expressão durante a fase de proliferação das células satélites. No grupo R3 não foi observada qualquer alteração significativa na expressão desses genes (Quadro 5). Estes dados nos permitem inferir que apenas 3 dias de treinamento aeróbio de natação foram suficientes para provocar uma maior expressão dos genes.

Nos grupos submetidos a 7 dias de recuperação, após atrofia, não foi observada alteração significativa na expressão gênica da MyoD e da Miogenina nos grupos R7 e T7, em relação ao grupo C7, porém, após 7 dias de recuperação, ainda pode-se notar

uma tendência no aumento da expressão da MyoD no grupo T7, em relação ao grupo C7 (Quadro 6).

Quadro 4. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos do grupo imobilizado (I) em relação ao grupo controle. A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo *versus* grupo C (*P < 0,05).

	C	I
MyoD	1	1,188
Miogenina	1	0,9081

Quadro 5. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos dos grupos recuperado e treinado 3 dias (R3 e T3) em relação ao grupo Controle 3 dias (C3). A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo *versus* grupo C3 (*P < 0,05).

	C3	R3	T3
MyoD	1	0,4625	6,8962 *
Miogenina	1	0,7496	1,5305 *

Quadro 6. Expressão relativa de Miogenina e MyoD estimada por RT-qPCR no músculo sóleo de ratos dos grupos recuperado e treinado 7 dias (R7 e T7) em relação ao grupo Controle 7 dias (C7). A expressão de cada transcrito foi normalizada pela expressão de Ppib e Ppia. Estatisticamente significativo *versus* grupo C7 (*P < 0,05).

	C7	R7	T7
MyoD	1	0,8316	2,0692
Miogenina	1	0,8419	0,8442

5. DISCUSSÃO

Os valores alusivos ao peso corporal (PC) são de extrema importância, pois revelam as possíveis alterações morfológicas e funcionais dos tecidos corporais, sendo utilizados como fortes indicadores do crescimento somático e das adaptações ao estímulo de treinamento físico (Butkus *et al.*, 1995). No presente estudo, os valores referentes ao peso corporal inicial (PCI) e ao peso corporal final (PCF) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, devido ao controle da oferta de ração a todos os grupos durante todo o experimento. Consistente com estes resultados, o consumo alimentar também não foi diferente entre os grupos.

Algumas condições clínicas como as doenças catastróficas (câncer e AIDS), a anorexia e a inatividade física provocam a perda da massa muscular (Pattison *et al.*, 2003). Dentro da inatividade física, há o processo de imobilização, o qual é frequentemente usado em tratamentos para injúrias músculo-esqueléticas, apesar de resultar em atrofia da célula muscular, fibrose intramuscular e perda da extensibilidade, força e resistência muscular. A imobilização induzida acarreta em um maior

distanciamento entre as fibras musculares, pois provoca um aumento dos tecidos conectivos intramusculares, o perimísio e o endomísio. Simultaneamente, ocorre um decréscimo da área de secção transversal das fibras e da densidade capilar do músculo (Kannus *et al.*, 1998). Em nosso experimento, o processo de imobilização foi realizado através do uso de atadura gessada de secagem rápida, o qual promoveu uma redução significativa na relação peso do sóleo pelo comprimento da tíbia, assim como na área de secção transversal (AST) das fibras musculares dos ratos do grupo I, comparado aos ratos do grupo C. Semelhante aos nossos achados, Desplanches *et al.* (1987) obtiveram uma redução significativa de 63% do peso do músculo sóleo em ratos, após serem submetidos a 5 semanas de imobilização por suspensão da região posterior. Em adição, os mesmos observaram uma recuperação do peso do sóleo dos ratos submetidos a uma recuperação espontânea e também daqueles submetidos a um protocolo de treinamento de corrida em esteira durante 8 semanas. Pattison *et al.* (2003), observaram uma redução de 27% do peso do músculo sóleo de ratos, após estes serem submetidos a 10 dias de imobilização dos membros posteriores com atadura gessada; além disso, obtiveram um total restabelecimento do peso do músculo sóleo de ratos submetidos a recuperação espontânea, apenas 30 dias após a imobilização.

O treinamento de natação pode ter acelerado o processo de recuperação do músculo sóleo após atrofia. Nossos resultados mostram que a AST das fibras do grupo T3 não apresentou diferença significativa comparado ao grupo C3, enquanto que os animais do grupo R3 apresentou uma AST significativamente menor que o C3. Além disso, também não foi notada diferença significativa da AST do grupo T7 comparado ao grupo C7, enquanto que nos animais do grupo R7 foi observada diferença significativa em relação ao grupo C7. Desplanches *et al.* (1987) observaram uma recuperação da AST das fibras do músculo sóleo de ratos submetidos a uma recuperação espontânea,

assim como aqueles submetidos a um protocolo de treinamento de corrida em esteira durante 8 semanas.

Células satélites musculares são células miogênicas mononucleadas quiescentes que agem como uma população reserva de células capazes de atuar no crescimento pós-natal, na hipertrofia e na regeneração muscular em resposta à injúria (Morgan *et al.*, 2003). As células satélites podem ser detectadas no músculo devido a sua localização, pois estão localizadas entre o sarcolema e a membrana basal de fibras musculares e devido à identificação de diferentes proteínas expressas por estas células em diferentes estágios de seus ciclos celulares (Shenkam *et al.*, 2010).

Dentre estas proteínas, destacam-se os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) que controlam a ativação, proliferação e diferenciação de células da linhagem miogênica. As fases de ativação e proliferação das CS são caracterizadas pela alta expressão de MyoD e Myf5, enquanto na diferenciação ocorre um aumento na expressão de Miogenina e MRF4 (Zammit *et al.*, 2004).

Em nosso experimento, não foi observada alteração na quantidade de células satélites expressando Miogenina, MyoD e Pax 7 entre os grupos. No entanto, houve uma tendência no aumento destas células nos grupos T3 e T7: Pax 7 (razão: 0,0391 e 0,0363, respectivamente), Miogenina (razão: 0,0239 e 0,0310, respectivamente) e MyoD (razão: 0,0323 e 0,0382, respectivamente). Isso indica que o treinamento pode ter estimulado o aumento do número de células satélites bem como a sua proliferação/diferenciação, estimulando o processo de regeneração muscular após a imobilização. Dupont-Versteegden *et al.* (1998), após submeterem ratos a uma lesão na medula espinhal, notaram um aumento significativo nos níveis de células satélites Miogenina⁺ e de MyoD⁺ no músculo sóleo, 5 dias após a lesão, sendo estes níveis mantidos elevados em até 10 dias. Porém, os mesmos pesquisadores não observaram

qualquer alteração nos níveis de células satélites Miogenina⁺ e de células satélites MyoD⁺ em ratos submetidos a um protocolo de exercício aeróbio realizado em uma bicicleta motorizada, após 5 dias da transecção.

Semelhantemente, Liu *et al.* (2010) após provocarem uma injúria no cordão espinhal de ratos, não verificaram qualquer alteração significativa no nível de células satélites Pax7⁺ de ratos submetidos a um treinamento aeróbio em esteira por 2 dias após 6 dias de recuperação espontânea, assim como aqueles que foram submetidos a 8 dias de recuperação espontânea. Entretanto, ao submeterem um grupo de ratos a 14 dias de recuperação espontânea e outro grupo a um treinamento aeróbio em esteira por 5 dias após 9 dias de recuperação espontânea, observaram um aumento significativo no nível de células satélites Pax 7⁺, obtendo um aumento significativo no grupo submetido ao treinamento aeróbio em esteira.

MyoD e Miogenina são fatores transcricionais pertencentes à família dos Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs) encontrados na região regulatória de muitos genes músculo específico (Murre *et al.* 1989), incluindo genes estruturais e aqueles envolvidos com a formação das proteínas dos sarcômeros (Lin *et al.* 1991; Li and Capetanaki 1993; Wheeler *et al.* 1999). Assim, os MRFs podem contribuir na regulação da massa muscular controlando a taxa de síntese proteica. Os MRFs também estão envolvidos com a proliferação e a diferenciação das células satélites, que quando ativadas proliferam, se diferenciam e fundem-se às fibras musculares existentes promovendo a regeneração muscular (Rosenblatt *et al.* 1994; Lowe and Alway 1999). A MyoD é mais expressa durante a proliferação enquanto que a Miogenina é expressa em maior grau, durante o processo de diferenciação celular. No nosso estudo, a maior expressão da MyoD e da Miogenina no grupo T3, está relacionada à alta atividade de

proliferação e diferenciação das células satélites, em decorrência do treinamento utilizado.

Em nosso experimento, foi observado um aumento na expressão gênica da MyoD e da Miogenina no grupo dos animais submetidos a 3 dias de treinamento aeróbio de natação, após atrofia (grupo T3), em comparação ao grupo controle 3 dias (grupo C3). Em adição, pudemos notar uma tendência no aumento da expressão da MyoD no grupo dos animais submetidos a 7 dias de treinamento aeróbio de natação, após atrofia (grupo T7), em comparação ao grupo controle 7 dias (grupo C7). Dupont-Versteegden *et al.* (1998), após submeterem ratos a uma lesão na medula espinhal, notaram um aumento significativo nos níveis de expressão gênica da Miogenina e da MyoD no músculo sóleo, 5 dias após a lesão. No entanto, apenas o nível de MyoD foi mantido elevado 10 dias após a lesão. Em adição, os mesmos pesquisadores não observaram qualquer alteração nos níveis de expressão gênica da Miogenina e da MyoD em ratos submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio realizado em uma bicicleta motorizada, iniciado 5 dias após a transecção. Semelhantemente, após submeterem ratos a uma lesão na medula espinhal, Liu *et al.* (2010) observaram um aumento na expressão gênica da MyoD após 14 dias da lesão, enquanto que o nível de expressão da Miogenina permaneceu inalterado. Entretanto, foi verificado um aumento na expressão gênica da MyoD e da Miogenina nos grupos submetidos a treinamento aeróbio em esteira, após 8 dias da lesão (treinamento de 3 séries de 20 minutos cada) e após 14 dias da lesão (treinamento de 10 séries de 20 minutos cada), sendo notado o aumento mais proeminente na expressão da MyoD, após 8 dias da lesão, com o treinamento de 3 séries de 20 minutos. Assim, diferentes experimentos mostram o envolvimento dos MRFs MyoD e Miogenina com o processo de recuperação muscular, fato que também foi

evidenciado no nosso estudo, sendo esta recuperação mais evidente com 3 dias de recuperação, após 7 dias de imobilização.

6. CONCLUSÃO

Segundo a Relação Psóleo/Ctíbia, medida indireta da atrofia, o processo de imobilização promoveu uma redução significativa na no grupo I, em relação ao grupo C; nos grupos R3 e T3, em relação ao grupo C3 e no grupo R7, em relação ao grupo C7; enquanto que no grupo T7, o protocolo de treinamento aeróbio de natação utilizado foi suficiente para a recuperação muscular, já que não foi observada qualquer alteração em relação ao C7. Porém, de acordo com a mensuração da área de secção transversal (AST), uma medida direta da atrofia, o processo de imobilização promoveu uma atrofia nas células musculares do grupo I, em relação ao grupo C, assim como nos grupos R3 e R7, em relação aos grupos C3 e C7, respectivamente. No entanto, nos grupos T3 e T7, foi observada uma recuperação muscular, quando comparados aos grupos C3 e C7, respectivamente.

O protocolo de treinamento aeróbio utilizado promoveu um aumento da expressão gênica da MyoD e da Miogenina, sendo mais evidente com 3 dias de recuperação, após 7 dias de imobilização. A análise da imunofluorescência para Miogenina⁺, MyoD⁺ e Pax7⁺ não mostrou diferença entre os grupos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPELL, HJ. Skeletal muscle atrophy during immobilization. *Int J Sports Med* 7(1): 1-5, 1986.
- BAAR, K; NADER, N; BODINE, S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Bioch* 42:61-74, 2006.
- BARANY, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197-218, 1967.
- BICKEL, CS; SLADE, J; MAHONEY, ED; HADDAD, D; DUDLEY, A; ADAMS, GR. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol* 98:482-488, 2005.
- BISCHOFF, R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Myology, edited by Engel AG & Frazini-Armstrong C. *New York: McGraw-Hill* p.97-118, 1994.
- BUSTIN, SA; BENES, V; GARSON, JA; HELLEMANS, J; HUGGETT, J; KUBISTA, M; MUELLER, R; NOLAN, T; PFAFFL, MW; SHIPLEY, GL; VANDESOMPELE, J; and WITTEWER, CT.. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622, 2009.
- BUTKUS JA, BROGAN RS, GIUSTINA A, KASTELLO G, SOTHMANN M, WEHRENBURG WB. Changes in the growth hormone axis due to exercise training in male and female rats: secretory and molecular responses. *Endocrinology* 136(6):2664-70, 1995.
- CAMPOS, GE; LUECKE, TJ; WENDELN, HK; TOMA, K; HAGERMAN, FC; MURRAY, TF; RAGG, KE; RATAMESS, NA; KRAEMER, WJ; STARON, RS. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50-60, 2002.
- CHARGÉ, SBP and RUDNICK, MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238, 2004.
- DAVIS, RL; CHENG, PF; LASSAR, AB; and WEINTRAUB, H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60: 733-746, 1990.
- DESPLANCHES, D; MAYET, MH; SEMPORE, B; FRUTOSO, J and FLANDROIS, R. Effect of spontaneous recovery or retraining after hindlimb suspension on aerobic capacity. *American Physiological Society* 0161-7567/87, 1987.
- DUPONT-VERSTEEGDEN, EE; HOULE, JD; GURLEY, CM; and PETERSON, CA. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 275:C1124-C1133, 1998.

GOLDSPINK, G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J. Anat.*, v.194, p.323-334, 1999.

HAMEED, M; ORRELL, RW; COBBOLD, M; GOLDSPINK, G; and HARRIDGE, SD. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* 547: 247-254, 2003.

HAWKE, TJ e GARRY, DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 9(2): 534-551, 2001.

HAWLEY, JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pham Physiol* 29: 218-222, 2002.

HUXLEY, HE. Structural changes during muscle contraction. *Biochem J* 125(4):85P, 1971.

KADI, F; BONNERUD, P; ERIKSSON, A; THORNELL, LE. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochem Cell Biol* 113(1): 25-29, 2000.

KANNUS, P; JOZSA, L; JÄRVINEN, TLN; KVIST, M; VIENO, T; JÄRVINEN, TAH; NATRI, A, and JÄRVINEN, M. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 84(4): 1418–1424, 1998.

LEPPER C, CONWAY SJ; FAN CH. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature* 460, 627-631, 2009.

LIU, M; STEVENS-LAPSLEY, JE; JAYARAMAN, A; YE, F; CONOVER, C; WALTER, GA; BOSE, P; THOMPSON, FJ; BORST, SE; VANDENBORNE, K. Impact of treadmill locomotor training on skeletal muscle IGF1 and myogenic regulatory factors in spinal cord injured rats. *Eur J Appl Physiol* DOI 10.1007/s00421-010-1392-z, 2010.

LOWE, DA e ALWAYS, SE. Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res* 296: 531-539, 1999.

LOWEY, S; SLAYTER, HS; WEEDS, AG; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42(1):1-29, 1969.

MACHIDA, S; BOOTH, FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 36(1): 52-59, 2004.

MAGAUDDA, L; MAURO, DD; TRIMARCHI, F; ANASTASI, G. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14(1):17- 21, 2004.

MATSAKAS, A; FRIEDEL, A; HERTRAMPF, T; DIEL, P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. *Acta Physiol Scand* 183, 299–307, 2005.

MORGAN, JE, and PARTRIDGE, TA. Muscle satellite cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 35, Issue 8, August 2003, Pages 1151–1156, 2003.

MOZDZIAK, PE; GREASER, ML; and SCHULTZ, EJ. Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J Appl Physiol* 84: 1359-1364, 1998.

MURRE, C; MCCAWE, PS; VAESSIN, H; CAUDY, M; JAN, LY; YAN, JN; CABRERA, CV; BUSKIN, JN; HAUSCHKA, SD; LASSAR, AB; WEINTRAUB, H; BALTIMORE, D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544, 1989.

PATTISON, JS; FOLK, LC; MADSEN, RW and BOOTH, FW. Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol* 95: 2171–2179, 2003.

PETTE, D; STARON, RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509, 2000.

PETTE, D; STARON, RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem cell biol* 115:359-372, 2001.

PSILANDER, N; DAMSGAARD, R; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 95(3):1038-1044, 2003.

SCHIAFFINO, S; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77(2):493–501, 1994.

SEALE, P e RUDNICKI, MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218(2): 115-124, 2000.

SHENKMAN, BS; TURTIKOVA, OV; NEMIROVSKAYA, TL; GRIGORIEV, AI. Skeletal Muscle Activity and the Fate of Myonuclei. *Acta Naturae*, vol. 2 N° 2 (5), 2010.

SILVA, CA; GUIRRO, RR; POLACOW, ML; CANCELLIERO, KM; DURIGAN, JL. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res* 39(7): 979-985, 2006.

TALMADGE, RJ; ROY, RR. Eletrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75(5): 2337-2340, 1993.

TRAPPE, S; HARBER, M; CREER, A; GALLAGHER, P; SLIVKA, D; MINCHEV, K; WHITSETT, D. Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101(3): 721-727, 2006.

ZAMMIT, PS; PARTRIDGE, TA; YABLONKA-REUVENI, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J Histochem Cytochem* 54(11): 1177-1191, 2006.

ZAR, JH. .Biostatistical analysis, 4thed. *Prentice-Hall New Jersey*, 633p, 1999.