

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE  
EQUINOS DA RAÇA PURO SANGUE ÁRABE AO  
TREINAMENTO DE ENDURO**

ADRIANA SPINELLI RINO

BOTUCATU-SP

Julho 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESPOSTA DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS  
DE EQUINOS DA RAÇA PURO SANGUE ÁRABE AO  
TREINAMENTO DE ENDURO**

ADRIANA SPINELLI RINO

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária para a  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rogério  
Martins Amorim

BOTUCATU-SP

Julho/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Rino, Adriana Spinelli.

Resposta das fibras musculares esqueléticas de eqüinos da raça  
Puro Sangue Árabe ao treinamento de enduro / Adriana Spinelli  
Rino. - Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501070

1. Eqüino. 2. Biópsia.

Palavras-chave: Biópsia; Eqüino; Fibra Muscular.

Nome do Autor: **Adriana Spinelli Rino**

Título: RESPOSTA DAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE EQUINOS DA RAÇA PURO SANGUE ÁRABE AO TREINAMENTO DE ENDURO EQUESTRE

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rogério Martins Amorim**

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

**Profa. Dra. Maria Verônica de Souza**

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – MG

**Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe**

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

**Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva**

Membro

Departamento de Morfologia

IB – UNESP - Botucatu

**Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves**

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 02 de julho de 2010

*Dedico este trabalho aos meus pais, Rosely Spínelli Rino e Plauto Sampaio Rino, pelo amor incondicional, abrindo mão dos seus próprios sonhos para realizar os sonhos de seus filhos.*

*Ao meu irmão Caio por encorajar-me e nunca  
fazer-me desistir.*

*Ao meu marido e companheiro Binho pelos  
nossos doces momentos de carinho, nossas  
aventuras e pelo grande amor que existe entre  
nós.*

- Meu maior e mais profundo agradecimento é ao meu DEUS, a Quem eu devo toda a minha gratidão pela realização deste trabalho.
- Aos meus pais, pois sem eles esta etapa jamais seria concluída.
- Ao meu irmão Caio Spinelli Rino que, muito contribuiu para a conclusão desta obra.
- Agradeço com muito amor e carinho ao meu marido *Binho* por sempre me apoiar e compreender a importância desta realização para mim. Sempre com um sorriso no rosto e com palavras de apoio e motivação. Mostrando-me sempre por onde seguir, mesmo quando eu queria ir no sentido contrário.
- Enfim, a toda a minha família, avós, tios, primos e aos meus sogros Alaíde e Jacob que também sempre me apoiaram com doces palavras de motivação.
- Um agradecimento especial à minha cunhada Rosana Jacob, por ser uma mulher especial com quem posso contar a todo e a qualquer minuto.
- Muito agradeço ao meu orientador, amigo, professor e mestre Dr. Rogério Martins Amorim pela sua dedicação para realização deste trabalho, sempre com suas idéias inovadoras, espírito desbravador, para buscar sempre o melhor resultado.
- Ao Médico Veterinário, Dr. Ricardo Summa, pela concessão da realização das biópsias musculares nos equinos deste estudo.
- Agradeço à Profa. Dra. Renée Laufer Amorim por muito contribuir para o aprimoramento dos métodos aplicados neste trabalho, cedendo seu tempo, sua experiência e seus conhecimentos, que foram de grande importância para mim.
- Agradeço especialmente à Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, por conceder o uso do laboratório de histologia e por nos auxiliar na execução desta pesquisa.
- Com muito carinho agradeço à técnica do laboratório de histologia, Sueli, pelos momentos de descontração, e por muito me ensinar nos procedimentos laboratoriais.
- À Profa. Dra. Eunice Oba, por conceder o uso do laboratório de endocrinologia para a utilização do Criostato.

- Aos meus amigos José Carlos e Ronaldo, técnicos do laboratório de patologia da FMB, que me ensinaram e muito contribuíram para confecção das lâminas histológicas.
- À minha amiga, irmã e companheira Janaína Socolovski Biava, por sua cumplicidade, amizade, momentos de diversão e principalmente por nossas idas às “lojinhas” de Botucatu.
- À minha amiga Silvia Lorena Sá por nossos momentos de descontração e bate-papo para aliviar as tensões diárias. Pelas caronas para a cidade de Campinas, que delícia!!!!!!
- Aos meus amigos da pós-graduação da clínica de grandes animais, Paulo Henrique Jorge, Peres Ramos Badial, Andreza Amaral, Ulisses Stelmann, Danilo (*Pebinha*), José Filho, Carolina Gimenez, Carla Ulian e a mais nova Mayra pelo companheirismo e momentos de alegria com eles vivido.
- Aos professores da clínica de grandes animais Simone Biagio Chiacchio, Roberto Calderon Gonçalves e Alexandre Borges, pela amizade, carinho e por compartilharmos momentos de descontração e brincadeiras.
- Aos funcionários da clínica de grandes animais “Marcão” e “Marquinhos” por sempre estarem dispostos a ajudar no que precisei.
- Aos secretários da seção de Pós-Graduação da FMVZ-Unesp Botucatu, José Roberto e Maria, por estarem sempre dispostos a nos ajudar, sempre com um sorriso no rosto e sempre de boa vontade.
- A todos vocês o meu MUITO OBRIGADA !!!!!!!

*Dei a minha beleza e a minha juventude aos  
homens. Agora, dou a minha sabedoria e minha  
experiência, o melhor de mim aos animais.*

*Brigitte Bardot*

## TABELAS

|                                                                                                                                                                                           | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TABELA 1. Características dos diferentes tipos de fibras musculares em equinos, tomando por base as técnicas NADH-tr; mATPase; imunoistoquímica.....                                      | 13     |
| TABELA 2 – Porcentagem individual dos tipos de fibras dos grupos G1 e G2.                                                                                                                 | 39     |
| TABELA 3. Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem das fibras musculares segundo grupo e tipo.....                                                                                | 50     |
| TABELA 4 Porcentagens das fibras musculares dos tipos I e II detectadas pelas técnicas histoquímicas mATPase e NADH-tr e imunoistoquímica com anticorpo anti-MyHC nos grupos G1 e G2..... | 50     |
| TABELA 5. Média e desvio padrão das variáveis segundo grupo e tipo de fibra.....                                                                                                          | 51     |
| TABELA 6. Média e desvio padrão da área relativa de corte transversal (%CSA) dos tipos de fibras do músculo glúteo médio de equinos PSA dos grupos G1 e G2                                | 52     |
| TABELA 7 Avaliação de desempenho dos cavalos do G1 e a porcentagem das fibras musculares.....                                                                                             | 53     |

## FIGURAS

### Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. A - Agulha de biópsia percutânea do tipo Bergström nº 8.0. Composta de: 1- Corpo da agulha com janela de abertura para obtenção do fragmento muscular; 2- Cilindro cortante e 3- Mandril para remoção do fragmento muscular do interior da agulha. B. Agulha fechada, com mandril e cilindro cortante acoplados.....                                           | 40 |
| FIGURA 2. A – Determinação do ponto de perfuração e realização de tricotomia em uma área de aproximadamente 25 cm <sup>2</sup> . B – Inserção da agulha de biópsia após incisão da pele a uma profundidade de 9 cm. C – Sutura da pele com ponto simples e aplicação de pomada cicatrizante. D – Remoção do fragmento muscular da agulha através da janela cortante..... | 42 |
| FIGURA 3. A - Fragmento muscular sobre papel filtro, para absorção dos líquidos tissulares e fim dos processos de contração muscular. B – Fragmento muscular disposto em cassete e envolto em talco neutro utilizado como crioprotetor.....                                                                                                                              | 43 |
| FIGURA 4. A – Corte transversal músculo glúteo médio de equinos, corado pela técnica histoquímica NADH-TR. B - Corte transversal músculo estriado esquelético corado pela técnica histoquímica mATPase. Observar os campos microscópicos idênticos em aumento de 200x, com o padrão mosaico clássico .....                                                               | 48 |
| FIGURA 5. Corte transversal do músculo Glúteo médio de equinos submetido à reação de imunoistoquímica de dupla marcação para a diferenciação das fibras de MyHC I e MyHC II.....                                                                                                                                                                                         | 49 |

## ABREVIações

|                         |                                                         |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>AMP-desaminase</b>   | Adenosina Monofosfatase Desaminase                      |
| <b>ATP</b>              | Adenosina Trifosfato                                    |
| <b>°C</b>               | Grau Celsius                                            |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>  | Íon Cálcio                                              |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Cloreto de Cálcio                                       |
| <b>cm</b>               | Centímetro                                              |
| <b>CoCl<sub>2</sub></b> | Cloreto de Cobalto                                      |
| <b>DNA</b>              | Ácido Desoxirribonucléico                               |
| <b>Kda</b>              | Quilo Dálton                                            |
| <b>Km</b>               | Quilómetro                                              |
| <b>mATPase</b>          | Adenosina Trifosfatase Miofibrilar                      |
| <b>mL</b>               | Mililitro                                               |
| <b>mm</b>               | Milímetro                                               |
| <b>µm</b>               | Micrômetro                                              |
| <b>MyHC</b>             | Cadeia Pesada de Miosina                                |
| <b>NaCl</b>             | Cloreto de Sódio                                        |
| <b>NaOH</b>             | Hidróxido de Sódio                                      |
| <b>NADH-tr</b>          | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazolium Redutase |
| <b>NBT</b>              | Nitro Blue Tetrazolium                                  |
| <b>pH</b>               | Potencial Hidrogeniônico                                |
| <b>PCR</b>              | Reação Cadeia Polimerase                                |
| <b>PSA</b>              | Puro Sangue Árabe                                       |
| <b>RNA</b>              | Ácido Ribonucléico                                      |

## SUMÁRIO

|                                                                                                     |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                          | <b>1</b> |
| <b>II. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                              | <b>4</b> |
| 2.1. <i>Anatomia e fisiologia do músculo esquelético .....</i>                                      | 4        |
| 2.2. <i>O mecanismo de contração muscular .....</i>                                                 | 5        |
| 2.3. <i>A composição do músculo esquelético quanto aos tipos de fibras.....</i>                     | 7        |
| 2.4. <i>As fibras musculares e a velocidade de contração.....</i>                                   | 8        |
| 2.4.1 <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica histoquímica mATPase.....</i>      | 9        |
| 2.4.2. <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica histoquímica NADH-tr.....</i>     | 10       |
| 2.4.3. <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica imunoistoquímica.....</i>         | 11       |
| 2.4.4. <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica de ELISA e eletroforese.....</i>  | 14       |
| 2.4.5. <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica de hibridização in situ .....</i> | 14       |
| 2.4.6. <i>Classificação das fibras musculares por meio da técnica de PCR..</i>                      | 14       |
| 2.5. <i>AS FIBRAS MUSCULARES HÍBRIDAS E O PROCESSO DE PLASTICIDADE MUSCULAR .....</i>               | 15       |
| 2.5.1. <i>Atividade Neuromuscular.....</i>                                                          | 20       |
| 2.5.2. <i>Trabalho mecânico com carga e sem carga .....</i>                                         | 22       |
| 2.5.3. <i>Hormônios .....</i>                                                                       | 23       |
| 2.5.4. <i>Idade.....</i>                                                                            | 25       |
| 2.6. <i>A MODULAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES.....</i>                                                  | 26       |
| 2.6.1. <i>Possíveis mecanismos envolvidos na modulação dos tipos de fibras .....</i>                | 26       |
| 2.7. <i>A RESPOSTA DO MÚSCULO FRENTE AO EXERCÍCIO .....</i>                                         | 28       |
| 2.7.1. <i>O treinamento para exercício de resistência .....</i>                                     | 29       |

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.2. Alterações nas fibras musculares decorrentes da interrupção do treinamento.....          | 32        |
| 2.8. O CAVALO PURO SANGUE ÁRABE E O ENDURO EQUESTRE .....                                       | 34        |
| 2.9. BIÓPSIA MUSCULAR.....                                                                      | 35        |
| <b>III. OBJETIVOS.....</b>                                                                      | <b>37</b> |
| <b>IV. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                              | <b>38</b> |
| 4.1. ANIMAIS.....                                                                               | 38        |
| 4.2. TREINAMENTO DE ENDURO.....                                                                 | 40        |
| 4.3. COLETA DAS AMOSTRAS .....                                                                  | 40        |
| 4.3.1. A técnica de biópsia muscular .....                                                      | 40        |
| 4.4. PREPARO E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....                                                    | 42        |
| 4.5. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS .....                                                               | 43        |
| 4.5.1. Nicotinaminda Adenina Dinucleotídeo Tetrazolium Redutase (NADH-tr) .....                 | 43        |
| 4.5.2. Adenosina Trifosfatase Miofibrilar (mATPase) .....                                       | 44        |
| 4.6. TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA .....                                                             | 45        |
| 4.7. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....                                                               | 45        |
| <b>V. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>                                                            | <b>46</b> |
| <b>VI. RESULTADOS .....</b>                                                                     | <b>47</b> |
| 6.1. ANÁLISES HISTOQUÍMICAS .....                                                               | 47        |
| 6.1.1. Avaliação da capacidade oxidativa das fibras musculares .....                            | 47        |
| 6.1.2. Atividade de mATPase pH 9.8.....                                                         | 47        |
| 6.2. IMUNOISTOQUÍMICA.....                                                                      | 49        |
| 6.3. MORFOMETRIA .....                                                                          | 50        |
| 6.3.1. Percentual dos tipos de fibras musculares .....                                          | 50        |
| 6.3.2. Percentuais estabelecidos pelas técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas.....          | 50        |
| 6.3.3. Média da área de secção transversal, diâmetros maior e menor das fibras musculares ..... | 51        |
| 6.4. DESEMPENHO ATLÉTICO DOS EQUINOS PSA PERTENCENTES AO GRUPO NÃO TREINADO .....               | 52        |
| <b>VII. DISCUSSÃO .....</b>                                                                     | <b>53</b> |

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| <b>VIII. CONCLUSÕES .....</b>              | <b>64</b> |
| <b>IX.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>65</b> |
| <b>X.APÊNDICE.....</b>                     | <b>83</b> |

RINO, A. S. **Resposta das fibras musculares esqueléticas de equinos da raça Puro Sangue Árabe ao treinamento de enduro.** Botucatu, 2010. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

As fibras musculares esqueléticas são entidades versáteis, capazes de alterar seus fenótipos de acordo com a demanda energética. Para avaliar os efeitos do exercício de enduro no músculo esquelético, foram utilizados neste estudo 36 equinos da raça Puro Sangue Árabe divididos em dois grupos: treinados e não treinados para enduro. Foram obtidos fragmentos musculares da região profunda do músculo glúteo médio e processados para técnicas histoquímicas e imunoistoquímica, utilizando-se anticorpos específicos contra isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC) lenta e rápida. As fibras identificadas pela histoquímica e imunoistoquímica foram analisadas uma a uma. Determinou-se a porcentagem dos diferentes tipos de fibras musculares, e avaliou-se que, a porcentagem das fibras do tipo IIA foi significativamente mais alta do que a porcentagem das fibras dos tipos I e IIX no grupo não treinado ( $P < 0,05$ ). Em contra partida, a porcentagem das fibras do tipo I foi significativamente mais alta do que a porcentagem das fibras dos tipos IIA e IIX no grupo treinado ( $P < 0,05$ ). Também foram analisados, a média da área de corte transversal e o menor diâmetro da fibra e observou-se que, a média de corte transversal das fibras do tipo IIX foi significativamente maior comparada à média de corte transversal das fibras dos tipos I e IIA em ambos os grupos. Em conclusão pode-se afirmar que, o exercício de enduro em equinos aumenta a população das fibras de contração lenta, em detrimento da população de fibras de contração rápida.

Palavra-chave: Equino, biópsia, fibra muscular.

RINO, A. S. **Response of skeletal muscle fiber in Arabian horses in endurance training.** Botucatu, 2010. 106p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Paulista – UNESP.

## **ABSTRACT**

The skeletal muscle fibers are versatile entities capable to change their phenotype according to energy demand. To evaluate the effects of exercise over equine skeletal muscle in this study, 36 Arabian horses divided in 2 groups trained and untrained for endurance were used. The samples were obtained from the deep region of the gluteus medius muscle and processed for histochemistry and immunohistochemistry using specific monoclonal antibodies to selected fast and slow isoforms myosin heavy chain (MyHC). The histochemical and immunohistochemical categorization of the muscle fiber types were compared fiber by fiber. It was analyzed the percentage of different fiber types where, in the untrained group, the percentage of the fiber type IIA was higher significantly than the percentage of fiber types I and IIX ( $P < 0.05$ ). Unlike, the group trained showed a higher proportion of fiber type I than the fiber type IIX ( $P < 0.05$ ). The cross section area and lesser fiber diameter were also analyzed, and showed that, CSA of fiber type IIX was higher significantly than fibers I and IIA ( $P < 0.05$ ) in both groups. In conclusion, endurance exercise in equines increase the population of slow-twitch fibers in detriment of fast-twitch fibers.

Key words: Equine, biopsy, muscle fiber type.

## I. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético dos mamíferos é um tecido extremamente heterogêneo, composto por uma grande variedade de tipos de fibra (PETTE & STARON, 1997;2001). É um tecido dinâmico, o qual permite alterar suas características fenotípicas, possibilitando melhor adaptação funcional com estímulos variados (GOLDSPINK, 2003; MCKOY, 2005; CAPITANIO et al.,2006).

Adapta-se quando estimulado por diferentes fatores quais sejam, variações na atividade contrátil, no fornecimento de substrato energético e nas alterações em fatores ambientais (FLYCK & HOPPELER, 2003).

Desde o desenvolvimento embrionário dos mamíferos, as células musculares primitivas começam a expressar as proteínas contráteis específicas antes do músculo ser innervado. Dessa forma, o fenótipo da fibra muscular aparenta ser uma propriedade celular geneticamente existente em sua origem embrionária (HAYS & ARMBRUSTMACHER, 1999).

A adaptabilidade do tecido muscular durante o crescimento após o nascimento na realização do exercício depende de mudanças qualitativas e quantitativas na expressão gênica induzida por diversos estímulos, e essa adaptação envolve seletivamente à indução ou repressão da expressão de subconjuntos de genes (GOLDSPINK, 1999; 2005).

Os estímulos mecânico influenciam a expressão gênica no músculo e em outros tipos celulares como fibroblastos e osteoblastos. A adaptação com relação à massa muscular se dá tanto de forma local como sistêmica, entretanto, quando só um determinado músculo é exercitado, somente este se torna hipertrófico e não todos os músculos do corpo (GOLDSPINK, 2005).

As adaptações metabólicas e contráteis das fibras musculares estão presentes desde o nascimento, promovendo os meios pelos quais, potros recém-nascidos desenvolvem uma rápida velocidade de explosão muscular e metabolismo glicolítico necessários para a fuga de seus predadores, visto que o músculo esquelético dos equinos é muito rico em glicogênio, possui alta capacidade glicolítica e o leite materno é uma fonte rica de açúcar para o

metabolismo energético. Durante os dois primeiros anos de vida de um cavalo já ocorre uma alteração na proporção dos tipos fibras musculares, onde as fibras do tipo IIA aumentam em detrimento das fibras do tipo IIX. Dependendo da raça, pode haver um aumento gradativo da capacidade oxidativa das fibras do tipo II, o que promove uma velocidade de contração ligeiramente mais lenta e, aumentando a capacidade do animal permanecer em estação. Essas alterações ocorrem naturalmente e se intensificam com treinamento, que se dá dos 18 meses aos 3 anos de idade (VALBERG & BORGIA, 2006).

Os principais fatores que determinam as características fenotípicas musculares são: o tipo de inervação, a atuação de hormônios, a atividade contrátil (LIEBER, 1992; BIGARD et al., 1996; GOLDSPINK, 2005), e a condição de alongamento (GUNNING & HARDEMAN 1991; GOLDSPINK et al., 1992; STARON, 1993; SAKIYAMA et al., 2005).

Com o advento das técnicas histoquímicas, imunoistoquímica, eletroforese, hibridização *in situ*, PCR e os profundos conhecimentos nas áreas de biologia celular, tecidual, genética e saúde, propiciaram grandes benefícios e facilidades ao estudo das adaptações e alterações musculares em treinamento físico, particularmente em relação à expressão de proteínas musculares envolvidas na contração muscular, como a miosina, e que garantem a especificidade desse processo.

Sendo assim, a proposta do presente estudo foi realizar experimento com equinos da raça Puro Sangue Árabe (PSA) treinados e não treinados para competições de enduro equestre, buscando avaliar a composição muscular esquelética do equino, tomando por base os diferentes tipos de fibras musculares, procurando identificar o percentual de cada tipo de fibra (I, IIA e IIX) e, elucidar a estrutura e a plasticidade muscular, as alterações e as adaptações deste tecido através de estímulos patológicos e/ou fisiológicos e, em especial, à expressão de cadeia pesada de miosina (MyHC) nestes diferentes processos de remodelamento muscular frente ao exercício.

A perspectiva deste trabalho foi a de contribuir para o aprofundamento do estudo da tipificação das fibras musculares esqueléticas e suas propriedades contráteis e metabólicas na espécie equina.

O estudo sobre a composição do músculo esquelético do equino irá irradiar conquistas e valores científicos, considerando-se que o equino de alta performance atlética é de há muito considerado como animal de grande valia para a sociedade.

Como existem variadas modalidades de práticas esportivas equestres e cada qual exige trabalho muscular específico, o estudo da tipificação das fibras musculares esqueléticas e das suas propriedades metabólicas e contráteis na espécie equina, ganha foro de grandiosa importância.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Anatomia e fisiologia do músculo esquelético

O músculo esquelético é assim chamado porque se insere nos ossos através dos tendões. É o tecido mais abundante do corpo, compreendendo cerca de 40% do peso corporal dos mamíferos. No cavalo da raça Puro Sangue Inglês, a musculatura esquelética constitui 52% do peso corpóreo, comparada com 42% em outras raças (GOLL, 1996).

O tecido muscular esquelético consiste de feixes de células musculares cilíndricas e alongadas dispostas paralelamente, chamadas de fibras musculares e é recoberto externamente por uma camada de tecido conjuntivo chamada epimísio. Cada feixe muscular é envolto por outra fina camada de tecido conjuntivo, o perimísio. As fibras musculares representam a unidade morfofuncional do músculo esquelético e, cada qual é revestida pelo endomísio. Essas fibras representam o resultado coordenado da expressão de proteínas estruturais e enzimas metabólicas (POWERS & HOWLEY, 2000).

As fibras musculares são células especializadas, formadas por miofibrilas, que são estruturas multinucleadas resultantes da fusão de vários mioblastos. Elas possuem inúmeras organelas e seus núcleos estão localizados ao redor da periferia da célula e abaixo do sarcolema (POWERS & HOWLEY, 2000).

Como bem explicam Snow & Valberg (1994), as fibras do músculo esquelético dos equinos contêm de 100 a 200 núcleos. As células satélites, importantes na reparação de injúrias musculares encontram-se abaixo do sarcolema e sobre a membrana basal.

Proteínas, como a mioglobina e enzimas envolvidas na glicólise, bem como os grânulos de glicogênio e gotículas de lipídeos estão distribuídos no sarcoplasma entre os miofilamentos e sob o sarcolema. As enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo estão localizadas no interior das membranas mitocondriais. As mitocôndrias dos músculos dos equinos concentram-se abaixo do sarcolema, associadas aos capilares, embora também estejam presentes entre as miofibrilas (SNOW & VALBERG, 1994).

Os filamentos protéicos estão arrançados em unidades chamadas sarcômeros, os quais são formados pelos filamentos de proteínas contráteis, de actina e miosina. Os filamentos finos de actina e os filamentos grossos de miosina conferem ao músculo o aspecto estriado característico da musculatura estriada esquelética (HOOPER & THUMA, 2005; JANSEN & PAVLATH, 2006).

As propriedades fisiológicas das fibras musculares são estabelecidas pelo padrão de inervação, onde se formam as unidades motoras, que são unidades constituídas pelo neurônio motor, seu axônio e pelas fibras musculares associadas (GONZALES & SARTORI, 2002). O neurônio motor é proveniente do corno anterior da medula espinhal (ENOKA, 1995). Um único axônio pode inervar de dezenas a milhares de fibras musculares, mas em média ficam em torno de poucas centenas (ENOKA & FUGLEVAND, 2001).

## **2.2. O mecanismo de contração muscular**

A miosina é a proteína contrátil mais abundante do músculo esquelético, representa um terço do total das proteínas musculares (PICARD et al., 2002), constitui a molécula motora da contração muscular e é o componente principal dos filamentos grossos das miofibrilas (SELLERS, 2000). É constituída por seis cadeias polipeptídicas, sendo quatro cadeias leves de 20 kDa e duas cadeias pesadas de 200 kDa (PETTE & VBORVÁ, 1992; POWERS & HOWLEY, 2000).

A correlação entre a propriedade contrátil e a cadeia pesada de miosina (MyHC) foi inicialmente demonstrada por Bárány (1967) e pela mensuração fisiológica das unidades motoras definidas histoquimicamente (CLOSE, 1967).

As proteínas da célula muscular esquelética são codificadas por uma família multigênica, denominada isoformas (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; EDDINGER, 1998, BOTTINELLI & REGGIANI, 2000).

As isoformas de MyHC são proteínas semelhantes entre si. A molécula da miosina apresenta dois extremos terminais, um corresponde à porção amino e o outro a porção carboxil. A região terminal NH<sub>2</sub>, que corresponde à porção amino de cada MyHC termina em uma cabeça globular,

a chamada região S1, que atua como motor durante o sistema de geração de forças do músculo, devido aos sítios ativos para a união com a actina e com a enzima adenosina trifosfatase miofibrilar (mATPase), responsável pela hidrólise do ATP (Adenosina Trifosfato) em difosfato de adenosina e fosfato inorgânico (PETTE & VBORVÁ, 1992; GALLER et al., 1997; KARLSSON et al., 1999). O terminal carboxil das MyHC enrola-se sobre si mesmo para formar a cauda da miosina (LENNINGER, 1981).

Para que ocorra a contração muscular é necessário que haja energia, energia esta que é oriunda da degradação do ATP pela enzima mATPase presente na cabeça da miosina, que origina difosfato de adenosina e fosfato inorgânico liberando a energia que irá ativar as pontes cruzadas de miosina, unindo a cabeça da miosina ao filamento de actina. Ocorre então uma alteração conformacional da molécula da miosina e parte da energia liberada é utilizada para produção de movimento entre os filamentos, onde os filamentos de actina deslizam-se sobre os filamentos de miosina. Cessado este processo, os produtos da hidrólise do ATP são liberados e se unem novamente reconstituindo a molécula de ATP (POWERS & HOWLEY, 2000).

A contração muscular é desencadeada pela chegada do impulso nervoso à junção neuromuscular. O potencial de ação que chega ao neurônio motor provoca a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular, que se liga aos receptores da placa motora, despolarizando a membrana celular através dos túbulos transversos da fibra muscular, resultando na liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático. O cálcio se liga à troponina, alterando a posição da tropomiosina e liberando os sítios ativos da actina. A ponte cruzada da miosina energizada forma uma ligação forte no sítio ativo da actina. Esse ciclo da contração é repetido enquanto houver cálcio e ATP presentes e se rompe, quando cessam os potenciais de ação e o retículo sarcoplasmático remove ativamente o cálcio do sarcoplasma (POWERS & HOWLEY, 2000).

A mais importante alteração molecular no fenótipo das miofibrilas e nas propriedades contráteis do músculo esquelético, quando estimulado pelo treinamento, é a expressão das isoformas da MyHC (PETTE & STARON, 2001), pois a MyHC é a porção da molécula de miosina que determina a velocidade de reação das pontes cruzadas de miosina com os filamentos de

actina e, conseqüentemente, a velocidade de contração muscular (WILLIAMS et al., 2002).

Essas proteínas apresentam características bioquímicas, estruturais e fisiológicas comuns, mas demonstram alterações na sequência de aminoácidos, configurando ligeiras diferenças nas atividades biológicas, como a atividade da mATPase e a afinidade ao cálcio. E constituem parte essencial do sistema contrátil do músculo (PERRY, 1985).

As isoformas de cadeias pesada e leve de miosina dos músculos esqueléticos funcionam como proteínas reguladoras das propriedades contráteis das fibras musculares, pois determinam a velocidade máxima de contração muscular. A velocidade e a força de contração muscular dependem da quantidade de fibras musculares ativas, assim como de suas propriedades contráteis e metabólicas. A velocidade máxima de encurtamento de uma única fibra muscular está diretamente ligada com as isoformas de MyHC que predominam nas fibras musculares (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; McKOY et al., 1998; RIVERO & PIERCY, 2004).

Nos mamíferos, incluindo o homem, se conhecem nove isoformas de cadeia pesada de miosina, e cada uma delas é codificada por um gene diferente, apresentando atividade mATPase particular (BOTTINELLI & REGGIANI, 2000; ALLEN & LEINWAND, 2001; DA COSTA et al., 2002).

### **2.3. A composição do músculo esquelético quanto aos tipos de fibras**

O músculo esquelético dos equinos é composto por diferentes tipos de fibras musculares, capazes de realizar uma ampla variedade de atividades físicas devido à sua grande diversidade celular, molecular, especialização funcional e capacidade plástica. Essa característica proporciona ao tecido muscular a capacidade de gerar atividades de contração, à qual se traduz em maior eficiência mecânica e termodinâmica do organismo (GOLDSPINK, 1998).

Ao longo do tempo, vêm se aplicando diversas classificações, fundamentadas em técnicas que avaliam parâmetros bioquímicos, estruturais, funcionais e histoquímicos da fibra muscular para o estudo das características

fibrilares, tanto em músculos de animais como em humanos. A diferenciação clássica dos tipos de fibras era inicialmente baseada na coloração visual do músculo esquelético, sendo diferenciados em vermelho ou branco, segundo o seu conteúdo de mioglobina (BEECHER et al., 1965).

Assim, as fibras musculares foram primariamente classificadas em 1873, por Ranvier, baseando-se apenas na cor do músculo. A coloração vermelha do músculo se dá pela alta concentração de enzimas de metabolismo aeróbio, de mioglobina, e pela vascularização (KELLY, 1994; McCOMAS, 1996). Dessa forma, os músculos com mais de 40% de fibras vermelhas foram denominados vermelhos. Ao contrário, os que possuíam mais de 40% de fibras pálidas, recebiam o nome de músculos brancos (BEECHER et al., 1965).

Existem diferenças nas proporções dos tipos de fibras musculares para que o músculo esquelético possa realizar variadas atividades físicas; cada tipo de fibra muscular possui propriedades mecânicas e metabólicas distintas (LUTZ et al., 1998).

#### **2.4. As fibras musculares e a velocidade de contração**

Dentro de uma mesma fibra podem ocorrer diferentes combinações de MyHC, mas a isoforma predominante é a principal determinante de importantes propriedades fisiológicas como a velocidade de contração e resistência à fadiga (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996). Existe uma forte relação entre isoformas de MyHC e velocidade de encurtamento, onde a fibra pura do tipo IIX é de cinco a dez vezes mais rápida do que a fibra pura do tipo I (LARSSON & MOSS, 1993; BOTTINELLI et al., 1996; HARRIDGE, 1996; HARRIDGE et al., 1996). Também há uma relação entre a proporção de isoformas de MyHC e poder contrátil produzido em uma alta velocidade de contração (AAGAARD & ANDERSEN, 1998).

Em equinos, a tipagem muscular é uma metodologia que também pode ser empregada para avaliar as características funcionais geneticamente herdadas, e as adaptações induzidas pelo treinamento (LOPEZ-RIVERO, 1992). E, o músculo glúteo médio é considerado como sendo bastante adequado para o estudo da tipologia muscular, pois é um músculo muito recrutado durante exercícios (SNOW & GUY, 1976).

No músculo esquelético dos mamíferos adultos encontra-se uma sequência de tipos de fibras que estão de acordo com a principal isoforma MyHC presente na fibra sendo elas, fibra lenta com MyHC I $\beta$  e três fibras do tipo rápida denominadas IIA com MyHC Ila, tipo IID com MyHC IId (a MyHC IId e fibra do tipo IID equivalem à MyHC IIX e às fibras do tipo IIX respectivamente; PETTE & STARON, 1990; SCHIAFFINO & REGGIANI 1994, 1996).

#### **2.4.1 Classificação das fibras musculares por meio da técnica histoquímica mATPase**

As fibras musculares podem ser classificadas por meio de diferentes métodos. Uma das classificações se dá por meio da atividade ATPásica da miosina (mATPase) dependendo do tipo de MyHC que está constituindo a fibra muscular pois, a propriedade contrátil de cada tipo de fibra é determinada, em parte, pelo tipo e quantidade de MyHC presente em cada fibra (LEFEUVRE, 1996; LIBERA & CARPENE, 1997; BALDWIN & HADDAD, 2001; LIANG, 2007).

Assim, as fibras musculares podem ser classificadas em dois grandes grupos: de fibras lentas ou de contração lenta (**tipo I**) e de fibras rápidas ou de contração rápida (**tipo II**) (LEFEUVRE, 1996; BALDWIN & HADDAD, 2001).

A atividade da mATPase está intimamente relacionada ao predomínio do tipo de isoformas, que determinará as propriedades contráteis das fibras musculares (CHIKUNI et al., 2001).

Essa classificação em tipos I e II depende das diferentes intensidades de coloração das fibras, devido a suas diferenças próprias na sensibilidade ao pH. De um modo geral, as fibras do tipo I apresentam grande atividade quando colocadas em meio ácido, sendo que as fibras do tipo II são ativadas quando colocadas em meio básico (GUTH & SAMAHA, 1969; BROOKE & KAISER, 1970).

Embora a intensidade da coloração de mATPase dependa do conteúdo de MyHC das fibras, os métodos de eletroforese e imunoistoquímica permitem identificar de forma mais apurada, as diferentes isoformas de MyHC

presentes nas fibras musculares (GORZA, 1990; KLITGAARD et al., 1990). Mas, através da técnica histoquímica mATPase, Smerdu et al. (2009) identificaram 5 tipos de MyHC do músculo esquelético de ursos marrons, sendo elas as fibras dos tipo I, IIC, IIA, IIAx e IIX.

A isoforma de MyHCIIx do equino corresponde à isoforma IIb do músculo do rato, mas possui um maior peso molecular onde, uma interpretação alternativa é de que esta MyHC rápida no cavalo seria mais semelhante à isoforma IIx do músculo do rato. A MyHCIIx é a principal isoforma presente nas fibras do tipo IIX, amplamente distribuída no músculo esquelético de ratos e não são distinguidas das fibras do tipo IIA e IIB pela reação de mATPase (SCHIAFFINO et al., 1986 e 1989; GORZA, 1990).

A chamada fibra IIB em humanos expressa uma isoforma equivalente à isoforma MyHCIIx do rato e não à isoforma IIb do rato, sendo mais correto classificá-la como fibra IIX (ENNION et al., 1995).

Cada espécie animal possui uma distribuição fibrilar característica na musculatura esquelética. Nos equinos, assim como na maioria dos mamíferos, as fibras musculares seguem o padrão mosaico de distribuição, pela presença das fibras musculares dos tipos I, IIA e IIX, pertencentes às diferentes unidades motoras que se entremeiam umas com as outras (RIVERO & PIERCY, 2004).

#### **2.4.2. Classificação das fibras musculares por meio da técnica histoquímica NADH-tr**

Pela análise histoquímica também pode se ter uma outra classificação das fibras musculares, através da identificação das propriedades metabólicas de cada fibra muscular histoquimicamente e, para isso, estudam-se as enzimas chave dos metabolismos aeróbico e anaeróbico. De acordo com essas diferenças metabólicas, é possível chegar à seguinte classificação: **fibras rápidas glicolíticas** (*Fast Glycolytic-FG*), **fibras rápidas oxidativas** (*Fast Oxidative Glycolytic-FOG*) e **fibras lentas oxidativas** (*Slow Oxidative-SO*) (PETTE & VRBOVÁ, 1992).

Objetivando identificar as características fibrilares segundo as propriedades contráteis e o grau de resistência à fadiga Peter et al. (1972),

estudaram as propriedades motoras e metabólicas das fibras musculares, utilizando a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH) como marcador do padrão oxidativo da fibra muscular. Esta enzima se encontra na face interna da membrana mitocondrial e sua função é catalizar a transferência de elétrons do  $\text{NADH}_2$  a compostos citocromos, e por último ao oxigênio, na cadeia de transporte de elétrons (DUBOTWITZ & BROOKE, 1973).

A técnica histoquímica nicotinamida adenina dinucleotídeo *tetrazolium redutase* (NADH-tr) possibilita a identificação de unidades motoras com proteínas contráteis e metabólicas peculiares, dentre as quais destacaram-se as fibras **oxidativas** de contração lenta, que possuem unidades motoras resistentes à fadiga e metabolismo oxidativo; fibras rápidas **glicolíticas-oxidativas**, com atividade metabólica tanto glicolítica como oxidativa, média resistência à fadiga; e as fibras rápidas **glicolíticas**, as quais se caracterizam por apresentarem unidades motoras facilmente fatigáveis e metabolismo glicolítico (PETTE & VRBOVÁ, 1992).

#### **2.4.3. Classificação das fibras musculares por meio da técnica imunoistoquímica**

A identificação das diferentes isoformas de MyHC também pode ser estabelecida pela técnica de imunoistoquímica, com a utilização de anticorpos anti-MyHC, permitindo assim a identificação de fibras musculares **puras** e **híbridas** (STARON, 1997; PETTE et al., 1999; PICARD et al., 2003).

As fibras intermediárias se caracterizam por expressar mais de uma isoforma de MyHC (STARON et al., 1999; PICARD et al., 2002; STRBENC et al., 2004). Sendo assim, a classificação das fibras musculares vai além de apenas dois tipos de fibras. Pela análise imunoistoquímica, observam-se outros diferentes tipos de MyHC que configuram outras diferentes populações de fibras musculares (GOLDSPINK, 1998).

Através da análise imunoistoquímica, Staron et al.(1999), mostraram que, de um modo geral existem as fibras puras e as fibras híbridas. As fibras puras são aquelas classificadas como **I, IIA e IID ou IIX**.

A fibra IIX fora identificada e denominada fibra IID por Bar & Pette (1988), devido à sua presença em grande quantidade no músculo diafragma de ratos. Entretanto, Schiaffino et al. (1989), denominaram a fibra IID de IIX.

Por meio da imunoistoquímica definiram três tipos de fibras puras I, IIA e IIX e duas híbridas IIC e **IIAX**. Os métodos histoquímicos e imunoistoquímicos integrados demonstraram que, o músculo esquelético equino não expressa isoforma tipo IIB e as fibras assim denominadas, deveriam receber a denominação de fibras IIX (RIVERO et al., 1999; SERRANO & RIVERO, 2000; ETO et al., 2003).

As fibras híbridas podem ser encontradas co-expressando MyHC I/Ia e MyHC Ila/Ilx, a última existe de maneira mais comum (ANDERSEN et al., 1999).

Estudos comparativos de pequenos mamíferos apontam para diferenças espécie específicas sugerindo que, aumentando o tamanho do corpo altera-se o perfil das isoformas de MyHC rápida MyHCIIb para MyHCIIx e MyHCIIa (HÄMÄLÄINEN & PETTE, 1995).

Assim, a abundância relativa da isoforma rápida MyHCIIb diminui entre mamíferos com tamanho corpóreo maior, e não está expressa no músculo esquelético de grandes mamíferos como os seres humanos e outras espécies (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996; GOLDSPIK, 1998), incluindo cavalos (RIVERO et al., 1999).

A imunoistoquímica permite uma quantificação mais exata das fibras musculares corrigindo erros que são produzidos ao utilizar a técnica histoquímica na classificação de fibras híbridas e tipo IIB (ISLAS et al., 2001).

Através da utilização de anticorpos contra miosina rápida e lenta, Snow et al. (1981) relataram que houve uma correspondência entre a coloração de mATPase e o conteúdo de miosina de fibras puras, encontradas na co-expressão de fibras IIC definidas histoquimicamente das miosinas rápida e lenta. Outros trabalhos são necessários para determinar se, o mesmo padrão de co-existência de isoforma de MyHC está ou não presente em cavalos atletas.

As técnicas qualitativas para a atividade enzimática da mATPase (SNOW & GUY, 1976), NADH-tr (DUBOWITZ & BROOKE, 1973) e a imunoistoquímica (RIVERO et al., 1996) possibilitam com diferentes níveis de precisão, a identificação de cada tipo de fibra (Tabela 1).

**TABELA 1:** Características dos diferentes tipos de fibras musculares em equinos, tomando por base as técnicas NADH-tr; mATPase; imunoistoquímica

|                                              | Fibras Tipo I<br>(SO) | Fibras Tipo IIA<br>(FOG) | Fibras Tipo IIX<br>(FG) | Fibras Tipo<br>IIAX |
|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| <b>Velocidade de contração</b>               | Lenta                 | Rápida                   | Muito rápida            | ----                |
| <b>Tensão máxima desenvolvida</b>            | Baixa                 | Alta                     | Alta                    | ----                |
| <b>Atividade de miosina ATPase a pH 9.4</b>  | Baixa                 | Alta                     | Alta                    | ----                |
| <b>Atividade de miosina ATPase a pH 4.5</b>  | Alta                  | Baixa                    | Intermediária           | ----                |
| <b>Capacidade oxidativa</b>                  | Alta                  | Alta a intermediária     | Intermediária a baixa   | ----                |
| <b>Conteúdo lipídico</b>                     | Alto                  | Intermediário            | Baixo                   | ----                |
| <b>Capacidade glicolítica</b>                | Baixa                 | Alta                     | Alta                    | ----                |
| <b>Conteúdo de glicogênio</b>                | Intermediário         | Alto                     | Alto                    | ----                |
| <b>Fibras musculares por unidade motora</b>  | Baixa                 | Alta                     | Alta                    |                     |
| <b>Resistência à fadiga</b>                  | Alta                  | Intermediária            | Intermediária a baixa   |                     |
| <b>Anticorpo monoclonal Slow<sup>1</sup></b> | +                     | -                        | -                       | -                   |
| <b>Anticorpo monoclonal Fast<sup>2</sup></b> | -                     | +                        | +                       | +                   |
| <b>Anticorpo monoclonal SC-71</b>            | -                     | +                        | -                       | +                   |
| <b>Anticorpo monoclonal BF-35</b>            | +                     | +                        | -                       | +                   |
| <b>Anticorpo monoclonal S5-8H2</b>           | +                     | -                        | +                       | +                   |

+ reação positiva para o anticorpo monoclonal de acordo com o tipo de fibra muscular; - reação negativa para o anticorpo monoclonal de acordo com o tipo de fibra (SNOW & VALBERG, 1994; SCHIAFFINO et al., 1989; BARREY et al., 1998).

<sup>1</sup> M8421 SIGMA

<sup>2</sup> M4276 SIGMA

#### **2.4.4. Classificação das fibras musculares por meio da técnica de ELISA e eletroforese**

Rivero et al. (1996, 1999) identificaram, através da técnica de ELISA e eletroforese três tipos de isoformas MyHC presentes em diferentes músculos de equinos. Um tipo de MyHC lenta (MyHC-I) e duas rápidas (MyHC-IIa e MyHC-IIx).

E, no caso de co-existência de MyHC rápida e lenta, são necessários para estabelecer-se o grau de correspondência entre elas, os resultados da eletroforese e da imunoistoquímica, assim como dos padrões de coloração histoquímica (SERRANO et al., 1996).

#### **2.4.5. Classificação das fibras musculares por meio da técnica de hibridização *in situ***

No estudo realizado por Smerdo et al. (1994), evidenciou-se que, através da hibridização *in situ* em músculo esquelético em humano, as fibras do tipo IIB coradas pela mATPase correspondem às fibras que contêm maior quantidade de MyHC IIx transcriptas, e assim, as fibras do tipo IIB desta espécie identificadas histoquimicamente, poderiam corresponder ao tipo IIX descrito em outros mamíferos.

#### **2.4.6. Classificação das fibras musculares por meio da técnica de PCR**

Chikuni et al. (2004), utilizaram a técnica de PCR para a detecção de 3 isoformas de MyHC no músculo glúteo médio de equinos, e concluíram que, o equino não expressa a isoforma de MyHCIIb, pois esta isoforma não foi amplificada através do cDNA no tecido muscular, mas identificaram um pseudogene da isoforma de MyHCIIb.

A ausência da isoforma de MyHC IIb no músculo esquelético de equinos também foi observada por Rivero et al. (1999), onde afirmam que, a isoforma MyHCIIb não foi expressa pela detecção de proteínas e também não houveram evidências aos níveis do DNA.

## **2.5. As fibras musculares híbridas e o processo de plasticidade muscular**

Em seu estudo sobre as isoformas de MyHC em músculo esquelético de equino adulto através das técnicas de imunoistoquímica, Rivero et al. (1996), mostraram uma clara existência de três isoformas de MyHC no músculo de equinos adultos: uma lenta e duas rápidas. A distribuição diferencial destas MyHC definem três principais tipos de fibra contendo uma MyHC pura, sendo elas as fibras dos tipos I, IIA e IIX e, duas populações de fibras híbridas intermediárias contendo MyHC lenta e rápida, a chamada fibra híbrida I+IIA ou duas MyHC rápidas, a chamada fibra IIX.

As fibras híbridas ou intermediárias são resultado do estado de transição fenotípica entre dois tipos de fibras puras que podem ser estimuladas pelo treinamento ou interrupção do treinamento, ou pelo envelhecimento (PEUKER & PETTE, 1997; LEFAUCHEUR et al., 1998; PICARD et al., 2002).

Essas fibras possuem alto potencial de adaptação, já que são capazes de alterar o fenótipo das isoformas de cadeia pesada de miosina quando a demanda funcional do músculo necessita (BALDWIN & HADDAD, 2001).

A co-expressão de pares específicos das principais isoformas de MyHC resultam na formação de fibras híbridas, que podem ser subdivididas por meio da isoforma de MyHC dominante. Consequentemente, a sequência dos tipos de fibras híbridas podem ser assim distinguidas: tipo I/IIA, também chamada IC ( $\text{MyHC I}\beta > \text{MyHC IIa}$ ); tipo IIA/I, também chamadas IIC ( $\text{MyHC IIa} > \text{MyHC I}\beta$ ); tipo IIAD ( $\text{MyHC IIa} > \text{MyHC IIId}$ ); tipo IIDA ( $\text{MyHC IIId} > \text{MyHC IIa}$ ), tipo IIDB ( $\text{MyHC IIId} > \text{MyHC IIb}$ ), e tipo IIBD ( $\text{MyHC IIb} > \text{MyHC IIId}$ ) (PETTE & STARON, 2000).

Dependendo do tipo de músculo, um número considerável de fibras expressam duas isoformas de MyHC. Especialmente as isoformas IIA e IIX. As proteínas da fibra híbrida IIX são vistas regularmente e são consideradas como fibras de função intermediária entre as fibras do tipo IIA e IIX (ANDERSEN et al., 1999a; LINNANE et al., 1999; RIVERO et al., 1999;

STEPHENSON, 2001; DINGBOOM et al., 2002). A regulação de duas expressões de MyHC não é claramente compreendida.

Acredita-se que as proteínas de MyHC sejam primariamente controladas pela transcrição. O período de tempo e o estímulo limiar necessário para desencadear alterações no RNA mensageiro (RNAm) são importantes aspectos da regulação gênica (O'Neil et al., 1999).

Em fibras que são submetidas à transformação quanto ao tipo de fibra muscular, as alterações no RNAm da MyHC deveriam preceder as alterações nos produtos protéicos correspondentes, levando-as assim a uma incompatibilidade temporária na distribuição da transcrição e produtos protéicos correspondentes (ANDERSEN & SCHIAFFINO, 1997; JASCHINSKI et al., 1998).

Comparando-se as alterações na expressão do RNAm de MyHC e da proteína pode-se obter um indicativo da direção da alteração na expressão do gene da MyHC (EIZEMA et al., 2005).

Estudando o RNAm e a expressão protéica em cortes transversais do músculo glúteo médio, de seis equinos adultos, Eizema et al. (2005) mostraram que, em um cavalo, a maioria (%) das fibras analisadas tiveram os mesmos RNAm e a mesma expressão protéica, enquanto que uma minoria (%) mostrou incompatibilidade entre as expressões do RNAm e da proteína. As fibras do tipo IIA expressaram somente o RNAm da isoforma de MyHCIIa, uma minoria expressou somente o RNAm da isoforma de MyHCIIx e apenas uma fibra de um único animal entre os seis, expressou o RNAm da isoforma de MyHC I.

A maioria destas incompatibilidades está relacionada ao tipo mais comum de fibras híbridas, as quais expressam tanto a proteína da isoforma de MyHC IIa, quanto à proteína da isoforma de MyHC IIx, mas um único RNAm (EIZEMA et al., 2003).

No entanto, esta incompatibilidade entre RNAm e expressão de proteína da MyHC observadas nos cortes transversais das fibras musculares esqueléticas poderiam ser o resultado de uma distribuição não homogênea do

RNA<sub>m</sub> ao longo do comprimento da fibra muscular de roedores (NEWLANDS, et al., 1998).

Eizema et al. (2005) concluíram que, a expressão de MyHC nas fibras musculares híbridas são reguladas pela transcrição. O RNA<sub>m</sub> e a expressão protéica são homogeneamente distribuídos ao longo do comprimento das fibras do músculo glúteo médio de equinos. As fibras contendo duas proteínas de MyHC são convertidas mais provavelmente para outro tipo de fibra de acordo com a expressão do RNA<sub>m</sub> correspondente. A outra isoforma não será sintetizada por muito tempo e irá desaparecer progressivamente como resultado de uma proteína “*turnover*”. E, a fibra muscular híbrida do tipo IIAX neste estudo, foi ausente pela expressão do RNA<sub>m</sub> no músculo glúteo médio de equinos, através da identificação dos tipos de fibras musculares pela técnica de hibridização *in situ*.

Embora, as fibras híbridas de proteína de MyHC IIAX sejam consideradas como um tipo “verdadeiro”, por causa de seu regular aparecimento, elas também podem ser classificadas como fibras transitórias como sugerido por Pette & Staron (1997). A afirmação de que elas podem ser classificadas como fibras transitórias é apoiada pelos autores (ANDERSEN et al., 1999b; LINNANE et al., 1999, RIVERO et al., 1999; STEPHENSON, 2001; DINGBOOM et al., 2002).

O aparecimento de fibras híbridas e as incompatibilidades entre RNA<sub>m</sub> e proteína, indicam que, a transição do tipo de fibra ocorre em músculo esquelético presumidamente normal não submetidos a qualquer protocolo de treinamento (EIZEMA et al., 2005). Assim como nos equinos, as fibras híbridas IIAX também foram ausentes pelo RNA<sub>m</sub> nos músculos longissimus dorsi e rombóides de suíno, em razão de ser animal de grande porte (LEFAUCHEUR, 2002).

No músculo vasto lateral humano a grande maioria dos perfis de RNA<sub>m</sub> de MyHC corresponderam com a isoforma de proteína detectada, inclusive nas fibras híbridas (ENNIOON et al., 1995; ANDERSEN & SCHIAFFINO, 1997; ANDERSEN et al., 1999a; SERRANO et al., 2001).

Em um estudo comparativo de 14 músculos humanos diferentes, cerca de 60% de fibras híbridas IIAIX através da identificação da proteína, também foram híbridas IIAIX através da identificação do RNAm e, aproximadamente 30% expressaram somente RNAm IIA e 10% expressaram somente RNAm IIX (SMERDU et al., 1994; SMERDU & ERZEN, 2001).

No músculo gastrocnêmio de coelhos, músculo psoas e músculo adutor magno a análise das fibras puras revelaram que, dependendo do músculo, o número de fibras híbridas foi igual ou maior através da identificação do RNAm de MyHC do que através da identificação da proteína de MyHC (PEUKER & PETTE, 1997).

Em outro estudo (CONJARD et al., 1998) onde analisaram as fibras puras dos músculos reto femoral, extensor digital longo, tibial anterior e sóleo de coelho, os padrões de isoformas de RNAm de MyHC foram coerentes com os perfis de proteínas de MyHC, incluindo as fibras híbridas, na maioria das fibras de músculo normal, não transformado.

Em ratos, as fibras puras do músculo sóleo foram analisadas e novamente, mais fibras híbridas foram detectadas tanto através da identificação do RNAm, quanto através da identificação da proteína de MyHC (STEVENS et al., 1999).

Com base em alguns estudos está claro que, a detecção de fibras híbridas no músculo normal e não treinado é um fenômeno comum. O número de fibras híbridas é, entretanto, altamente espécie e músculo específico. Os estudos utilizando pequenos animais mostram um número maior de híbridas pelo RNAm comparado à proteína de MyHC. O músculo humano mostra números iguais ou menores desta correlação, os músculos de cavalo e suíno mostram quase que inexistência de fibras híbridas identificadas pelo RNAm (EIZEMA et al., 2005).

Estas diferenças podem ser devidas ao tamanho do animal, ao qual se impõem diferentes demandas ao músculo. Entretanto, a arquitetura e inervação do músculo também podem ser fatores importantes. Os pequenos animais têm uma arquitetura e um padrão de inervação diferentes comparados

aos primatas (HÄMÄLÄINEN & PETTE, 1995; PAUL, 2001; PAUL & ROSENTHAL, 2002).

Acredita-se que, a existência das fibras híbridas IIX seja ainda mais importante para a sintonia fina das propriedades contráteis comparados aos animais que tenham três isoformas rápidas disponíveis (HORTON et al., 2001; EIZEMA et al., 2003; CHIKUNI et al., 2004).

Muitos protocolos aplicados para induzirem a transformação das fibras musculares mostram que, na transformação a quantidade de fibras híbridas aumentam, até mesmo à expressão de três isoformas de proteínas de MyHC (TALMAGE, 2000).

Nesta transformação induzida, independentemente do tipo de protocolo aplicado, mais incompatibilidades entre o RNAm de MyHC e a expressão de proteína são observadas (ANDERSEN & SCHIAFFINO, 1997; CONJARD et al., 1998; ANDERSEN et al., 1999a; STEVENS et al., 1999).

A análise de fibras musculares puras e híbridas através da identificação do RNAm de MyHC e expressão de proteína é importante para o entendimento da situação homeostase e o processo de transformação. A regulação das MyHC dos tipos de fibras musculares é um processo complexo, finamente sintonizado pela regulação da transcrição da expressão de RNAm das MyHC, possibilitando ao músculo adaptar-se mesmo com alterações mínimas nas demandas mecânicas (HORTON et al., 2001; EIZEMA et al., 2003; CHIKUNI et al., 2004).

Em vista destas observações, deve-se se ressaltar que, a expressão de isoformas de MyHC não está somente sob controle transcriconal, mas também sob controle de tradução, e possivelmente sob controle pós-tradução. Uma separação destes diferentes níveis de controles resulta em incompatibilidades entre RNAm e proteína de MyHC (ANDERSEN & SCHIAFFINO, 1997; PEUKER & PETTE, 1997; PEUKER et al., 1998; ANDERSEN et al., 1999; STEVENS et al., 1999b).

A presença das fibras híbridas no músculo possibilita a transformação de um tipo de fibra para outro (PETTE & STARON, 1997). Em equinos de diferentes raças, as transições da fibra pura IIX para a fibra pura IIA

ocorre via fibra híbrida IIA (RIVERO & SERRANO, 1999; KARLSTRÖM & ESSÉN-GUSTAVSSON, 2002; KARLSTRÖM et al., 2009).

As fibras musculares são estruturas dinâmicas capazes de modificarem seus fenótipos sob várias condições, como por exemplo, alterando a atividade neuromuscular, mecanismo de sobrecarga, alterando o perfil hormonal, especialmente os hormônios tiroideanos e a idade. As alterações nas isoformas de MyHC tendem a seguir o esquema geral na sequência de transição de rápida para lenta e de lenta para rápida: MyHC I  $\leftrightarrow$  MyHC IIA  $\leftrightarrow$  MyHC IIX (PETTE & STARON, 2001), seguindo a hierarquia da atividade específica de ATPase e dispêndio de energia (BOTTINELLI et al, 1994b).

### **2.5.1. Atividade Neuromuscular**

A atividade neuromuscular é importante para o estabelecimento de fenótipos específicos da fibra muscular durante o desenvolvimento dos animais (RUBSTEIN & KELLY, 1978; PETTE & VRBOVÁ, 1985), e para a subsequente manutenção de suas propriedades fenotípicas. O impacto da atividade neural no fenótipo muscular foi demonstrado em numerosos experimentos de deservação (GUTMANN et al., 1972; CARRARO et al., 1985; SCHIAFFINO et al., 1988; JAKUBIEC-PUKA et al., 1990; d'ALBIS et al., 1994).

Similarmente, o modelo de reinervação cruzada elucida a importância da atividade neural através da demonstração da habilidade de transformação do fenótipo da fibra muscular (BULLER et al., 1960). Na ausência de inervação, os músculos lentos se tornam músculos mais rápidos e, os músculos rápidos se tornam músculos mais lentos. Isso resulta do decréscimo das concentrações relativas de MyHC I e MyHCIIb juntamente com os aumentos concomitantes na MyHCIIa e MyHCIIx (HUEY & BODINE, 1998, JAKUBIEC-PUKA et al., 1999). Quando um músculo rápido é reinervado por uma inervação lenta, este se torna um músculo lento e, quando um músculo lento é reinervado por nervo rápido este se torna um músculo rápido (PETTE & VBORVÁ, 1985).

O modelo mais frequentemente utilizado para modificar a atividade neural enviada ao músculo é via estimulação elétrica. De acordo com a

natureza dos padrões de impulsos neuromotores específicos lentos e rápidos, dois protocolos de estimulação elétrica foram desenvolvidos. A estimulação contínua de baixa frequência simulando o padrão de impulso de baixa frequência tônico, normalmente enviado ao músculo de contração lenta (SALMONS & VBORVÁ, 1969), e a estimulação de alta frequência fásica, simulando o padrão normalmente enviado para uma fibra de contração rápida (LÖMO et al., 1974).

A estimulação contínua de baixa frequência induz a importantes alterações na miosina as quais consistem de uma substituição das isoformas de MyHC rápidas pela isoforma de MyHC lenta. As alterações de fibras rápidas para lentas na expressão da isoforma de MyHC ocorrem na seguinte ordem: MyHCIIx  $\rightarrow$  MyHCIIa  $\rightarrow$  MyHCII $\beta$ . Durante a etapa final, da MyHCIIa para MyHC I $\beta$ , há uma regulação transitória da MyHCII $\alpha$  (PEUKER, 1999).

As transições nas isoformas de MyHC ao longo da sequência de transformação de rápida para lenta coincide com os aumentos pronunciados de fibras híbridas. À medida que a transformação ocorre, as fibras híbridas com isoformas de MyHC mais rápidas são finalmente substituídas por isoformas de MyHC mais lentas (CONJARD et al., 1998).

Da mesma forma que as alterações na expressão isoforma de MyHC, o padrão de cadeia leve de miosina também se submete à transição de rápida para lenta. A transição de cadeia leve, entretanto, não ocorre em sincronismo com as alterações nas isoformas de MyHC. Isto resulta em combinações de ambas as cadeias leve, lentas e rápidas com cadeias pesadas rápidas, especialmente a isoforma MyHCIIa. Assim, a transição induzida de fibra rápida para fibra lenta gera condições que aumentam significativamente o número de isomiosinas potenciais (LEEUEW & PETTE, 1996).

O músculo lento também pode ser submetido à estimulação contínua de baixa frequência, mas não terá efeito (PETTE et al., 1975, 1999), a não ser que o músculo seja desenergizado.

Sob condições fisiológicas, como aquelas que ocorrem durante o exercício de enduro, as unidades motoras são recrutadas em uma via ordenada, relacionada ao princípio do tamanho do indivíduo (SALMONS,

1994). Assim, as alterações resultantes do exercício de enduro resultam principalmente das unidades motoras que são ativadas somente de forma rara sob condições de resistência, mas cujo princípio é repetido durante o exercício (SERRANO et al., 2000).

### **2.5.2. Trabalho mecânico com carga e sem carga**

Similar à estimulação contínua de baixa frequência, a elasticidade e o trabalho mecânico com carga levam à transição de fibras rápidas para lenta. Entretanto, diferentemente da estimulação contínua de baixa frequência, estes modelos não parecem aumentar a atividade neuromuscular (PATTULO et al., 1992).

A sobrecarga de alongamentos produzida pela imobilização dos músculos rápidos em uma posição alongada gera um aumento na fração de fibras lentas (PATTULLO et al., 1992) e as transições de rápidas para lentas na expressão da isoforma de MyHC (LOUGHNA et al., 1990; GOLDSPINK et al., 1991; 1992; GOLDSPINK, 1999; LOUGHNA & MORGAN, 1999).

O modelo de hipertrofia compensatória também tem sido utilizado para estudar os efeitos da sobrecarga funcional no músculo esquelético (GOLDBERG, 1967).

O trabalho com poucas contrações musculares próximas ao máximo, realizadas contra cargas externas pesadas aplicadas três vezes por semana, sejam efetivas em suprimir quase em sua totalidade a quantidade de MHCIIx (STARON et al., 1994). Isto indica que, o número total de contrações (ou impulsos nervosos) não é o fator determinante quando regimes de alta tensão de carga muscular são aplicados. O inverso ocorre nos regimes de baixa carga de tensão muscular, com muitas contrações (p.e. enduro) (HOWALD et al., 1985).

Mais comumente, a tensão de carga máxima exercida sobre o músculo é um fator bem dominante. Sugere-se que, o grande poder de contração muscular pode direcionar para deformação estrutural do sarcolema e do citoesqueleto, ativando assim vias de sinalização presentemente não identificadas dependentes de elasticidade influenciando a regulação gênica dos

núcleos (WILLIAMS & NEUFER, 1996). Pode deduzir-se que, a carga de tensão mecânica através da via anteriormente mencionada desativaria ou diminuiria a regulação do gene IIX, enquanto aumenta a regulação do gene da MyHC Ila em todas as fibras do tipo II. Alterações características incluem aumento pronunciado em fibras lentas (IANUZZO et al., 1976; NOBLE et al., 1983; ROY et al., 1985), bem como aumentos significativos na MyHCI em ambos os aspectos de proteína e RNAm (GREGORY et al., 1986; TSIKA et al., 1987; MORGAN & LOUGHNA, 1989; PERIASAMY et al., 1989; GREGORY et al., 1990).

Os efeitos do trabalho mecânico sem carga têm sido estudados utilizando-se vários modelos incluindo a tenotomia, imobilização em posição encurtada, suspensão de membro posterior e microgravidade (PETTE & STARON, 1997). Sob estas condições, o músculo lento sem carga se torna mais rápido (VRBOVÁ, 1963). Estas alterações resultam da diminuição nas fibras do tipo I (BOOTH & KELSO, 1973; TEMPLETON et al., 1988; DESPLANCHES et al., 1990; RILEY et al., 1990; THOMASON & BOOTH, 1990; OHIRA et al., 1992; CAIOZZO et al., 1996), que correspondem à diminuições na concentração relativa de MyHC I e aumentos na MyHC Ila e MyHC IIX (THOMASON et al., 1987; OISHI, 1993; CAIOZZO et al., 1994; OISHI et al., 1994).

Esta transição de lenta para rápida foi mostrada, mais recentemente para aumentar a MyHC IIX (FAUTECK & KANDARIAN, 1995; STARON et al., 1998; SAITOH et al., 1999; STEVENS et al., 1999a; 1999b). O trabalho sem carga de um músculo rápido induz a mudanças menos evidentes que podem ser caracterizadas como transições de rápidas para mais rápidas. Dessa forma, músculos rápidos com sobrecarga parecem ser menos afetados comparados a músculos lentos sem carga.

### **2.5.3. Hormônios**

Alguns hormônios têm uma profunda influência na composição do tipo de fibra muscular de músculos específicos. Por exemplo, a testosterona mostra ter um efeito significativo na composição do tipo de fibra do músculo temporal de cobaias (LYONS et al., 1986; GUTMANN & HANZLÍKOVÁ, 1970),

do músculo laríngeo de rãs (CATZ, 1995), e possivelmente, do músculo masseter de coelhos (ENGLISH et al., 1999).

Um exemplo extremo de dimorfismo sexual é o músculo elevador anal de ratos. Este músculo desaparece durante o desenvolvimento da fêmea, mas pode ser mantido pela administração de testosterona (HANZLÍKOVÁ et al., 1970; JOUBERT et al., 1994). As diferenças hormonais, especialmente a testosterona, também pode contribuir para diferenças de gênero em tamanhos específicos de tipos de fibra que, posteriormente afeta a concentração relativa de isoformas de MyHC (STARON et al., 2000).

De todos os hormônios, os tireoidianos parecem ter o maior efeito fenotípico nas fibras musculares. Em geral, o hipotireoidismo leva à transição de rápida para lenta (IANUZZO et al., 1977; FITTS et al., 1980; NWOYE & MOMMAERTS, 1981), enquanto o hipertireoidismo leva as transições à direção lenta para rápida (PETTE & STARON, 1997).

Com relação à expressão de miosina, os baixos níveis de hormônios tireoidianos causam mudanças no sentido rápido para lento na expressão de isoformas de MyHC: MyHC IIx  $\rightarrow$  MyHC IIa  $\rightarrow$  MyHC I $\beta$ , enquanto que, altos níveis de hormônios tireoideanos causam mudança no sentido de lento para rápido na expressão de isoformas de MyHC: MyHC I $\beta$   $\rightarrow$  MyHC IIa  $\rightarrow$  MyHC IIx (IZUMO et al., 1986; FITZSIMONS et al., 1990; CAIOZZO et al., 1992; d'ALBIS & BUTLER-BROWNE, 1993; LARSSON et al., 1994; LI et al., 1996; CANEPARI et al., 1998).

Dependendo da composição inicial do tipo de fibra, cada músculo inicia o processo de transformação em um ponto específico ao longo da sequência. Além do impacto sobre os fenótipos das fibras musculares adultas, os hormônios tiroideanos desempenham um importante papel durante o desenvolvimento e maturação muscular. Baixos níveis de hormônios tiroideanos inibem ou retardam o aparecimento de isoformas de MyHC rápidas adultas, enquanto que, altos níveis destes hormônios aceleram a transição do desenvolvimento de isoformas de MyHC para as isoformas adultas rápidas (GAMBKE et al., 1983; BUTLER-BROWNE & WHALEN, 1984; SUGGIE & VERITY, 1985; BUTLER-BROWNE et al., 1987; d'ALBIS et al., 1987;

MAHDAVI et al., 1987; RUSSEL et al., 1988; d'ALBIS et al., 1990; ADAMS et al., 1999).

#### **2.5.4. Idade**

Além da atrofia muscular, estudos sugerem que a idade causa transições de rápida para lenta (LARSSON & ANSVED, 1995). Estudos transversais e longitudinais com músculos lentos e rápidos de ratos têm demonstrado mudanças relacionadas a idade no tipo de fibra e na composição da isoforma de MyHC. Em músculos rápidos de ratos existe uma aparente diminuição dependente da idade na concentração relativa de MyHCIIb com aumento concomitante na MyHCIIx, e potencialmente MyHCIIa e MyHC I (LARSSON et al., 1991; SUGIURA et al., 1992; LARSSON et al., 1993; DANIELI-BETTO et al., 1995; SULLIVAN et al., 1995; SKORJANC et al., 1998).

Além disso, uma diminuição na concentração relativa de MyHCIIa concomitante com um aumento na MyHCI foi relatada no músculo sóleo de ratos (SUGIURA et al., 1992; LARSSON et al., 1995; SULLIVAN et al., 1995). Esta lentificação motora com a idade do músculo sóleo maduro pode, entretanto, ser devido às mudanças em relação à idade nas propriedades da miosina lenta (HOOK et al., 1999).

Pelo fato de que, fatores extrínsecos e intrínsecos podem desempenhar uma função no processo de maturação, é difícil decidir se mudanças na composição do tipo de fibra e perfis de isoformas de MyHC representam eventos primários ou secundários. Assim, processos degenerativos no sistema nervoso central ou periférico, e também inatividade e alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos, podem contribuir para atrofia e/ou perda das unidades motoras rápidas ou fibras rápidas. Por exemplo, aumentos no agrupamento do tipo de fibra de músculos adultos sugerem processos de desinervação ou reinervação (LARSSON et al., 1991). Também parece haver um número reduzido de unidades motoras com tamanho aumentado em músculos maduros (BOOTH et al., 1994).

## **2.6. A modulação das fibras musculares**

As respostas adaptativas na expressão de isoformas de MyHC em qualquer das direções, de rápida para lenta, ou de lenta para rápida, ocorrem de forma gradativa. Este fato leva à idéia de que esta sequência gradativa nas transições de MyHC esteja relacionada às organizações gênicas dessas transições. Para humanos e camundongos, a organização gênica das isoformas de MyHC rápidas está na ordem MyHC IIa, MyHC IIx, MyHC IIb (WEISS et al., 1999b).

Da mesma forma, os estudos das fibras puras mostram que o potencial de fosforilação do ATP, como mostrado pela relação  $[ATP]/[ADP]$ , aumenta de MyHC I para MyHC II (CONJARD et al., 1998). Isto sugere que a ativação sequencial ou inativação dos genes de MyHC é de certa forma ligada à alterações no potencial de fosforilação do ATP (GREEN et al., 1992; CONJARD et al., 1998).

A sequência ordenada de transições de isoformas de MyHC é deduzida das trocas dependentes do tempo de isoformas de MyHC na direção de mais rápidas para mais lentas no músculo submetido à conversão de rápido para lento (STARON et al., 1987; TERMIN et al., 1989; LEEUW & PETTE, 1993; JASCHINSKI et al., 1998).

As fibras puras nos músculo em transformação confirmam aumentos que dependem do tempo nas fibras híbridas, indicando alterações sequenciais de rápidas para lenta (CONJARD et al., 1998) e também de lenta para rápida (STEVENS et al., 1999b).

### **2.6.1. Possíveis mecanismos envolvidos na modulação dos tipos de fibras**

Läuger (1991), explica em detalhes os mecanismos envolvidos na transição dos tipos de fibra: a transição nos tipos de fibras não envolve somente mudanças na expressão de miosina, mas incluem alterações nos perfis de isoformas de múltiplas proteínas da fibra muscular. Portanto, a transformação dos tipos de fibras representa um processo altamente coordenado por regulações gênicas.

As trocas de isoformas de proteína, ou mudanças em quantidade de proteína, envolvem todos os níveis de controle, conhecidamente como transcrição, tradução e proteólise. As atividades de transcrição e a tradução alteradas são responsáveis pela indução e repressão de genes, enquanto que a proteólise tem um importante papel na troca de isoformas de proteínas recém sintetizadas com seus complementos preexistentes (LÄUGER, 1991).

Estes processos coordenados suscitam a questão da existência e da natureza de elementos de controles superiores, capazes de exercerem efeitos sinérgicos e antagônicos. Neste contexto, as alterações no potencial de fosforilação da fibra muscular podem desempenhar um importante papel, pois tais mudanças podem ser transmitidas para várias vias sinalizadoras, relacionadas ao controle de expressão gênica, como por exemplo, a proteína kinase AMP-ativada e/ou a cascata proteína kinase  $\text{Ca}^{2+}$  dependente. Uma diminuição no potencial fosforilação do ATP reduz a função do retículo endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase e assim, tem um impacto imediato no sequestro do  $\text{Ca}^{2+}$  (LÄUGER, 1991).

Na verdade, a estimulação contínua de baixa frequência leva a um aumento pronunciado no  $\text{Ca}^{2+}$  livre nas fibras de contração rápida do músculo de coelhos (SRÉTER et al., 1987). Isso foi confirmado por estudos recentes que demonstraram um aumento duplo no  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular em fibras puras de músculos de rato estimuladas por baixa frequência (CARROLL et al., 1999).

Esta elevação no  $\text{Ca}^{2+}$  livre é interessante com relação à regra geralmente aceita de um segundo mensageiro versátil no controle da expressão gênica (HARDINGHAM & BADING, 1999). Além disso, a via cálcio-calcineurina está associada ao controle da expressão gênica em fibras musculares rápidas e lenta (CHIN et al., 1998; NAYA et al., 2000).

Nesta via regulatória, alterações nos níveis estáveis de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser um importante desencadeador para as transições dos tipos de fibra. Para comprovar este fato, níveis crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em culturas de miotubos mostraram aumentar a expressão de miosina lenta (KUBIS et al., 1997).

## **2.7. A resposta do músculo frente ao exercício**

As adaptações da musculatura esquelética durante o exercício e após um período de treinamento físico podem ser observadas de forma macroscópica, microscópica e bioquímica (ERIKSON, 1996). As alterações bioquímicas e fisiológicas produzidas são decorrentes da adaptação dos componentes miofibrilares às novas demandas energéticas, como resposta ao estresse metabólico dos músculos que participam ativamente no exercício. Dentre essas adaptações se destacam o incremento da capacidade oxidativa das fibras musculares, através do aumento da atividade das enzimas que intervêm na  $\beta$  oxidação dos ácidos graxos, do aumento da densidade mitocondrial e da capilarização (ESSÉN- GUSTAVSSON, 1996; SUCRE et al., 1999).

Dependendo da natureza dos estímulos de indução, a resposta adaptativa pode adotar a hipertrofia, nas quais miofibras aumentam em tamanho, mas que de qualquer forma retêm sua ultra estrutura inicial e propriedades bioquímicas, ou remodelamento sem hipertrofia, nas quais miofibras não aumentam, mas adquirem diferenças metabólicas e características estruturais, muitas vezes acompanhadas por alterações na micro circulação (BOOTH & BALDWIN, 1996).

Guyton (2002) ressalta ainda a hipertrofia e hiperplasia, o aumento das enzimas mitocondriais, o aumento nos componentes do sistema metabólico do fosfonogênio (ATP e fosfocreatina) e o aumento das reservas de glicogênio e triglicerídeos. Como consequência, ocorre melhoria na capacidade dos sistemas metabólicos, tanto anaeróbio como aeróbio, aprimorando especialmente a velocidade máxima de oxidação e a eficiência do sistema metabólico oxidativo.

Lindner et al. (2003) mostram que, dentre os principais efeitos fisiológicos que o treinamento produz no músculo esquelético equino são: a hipertrofia das fibras musculares, o aumento da proporção de determinado tipo de fibras, a conversão dos tipos de fibras, o aumento da atividade das enzimas oxidativas, o aumento da densidade mitocondrial, o aumento da densidade capilar, o aumento da atividade da enzima AMP-desaminase, nenhum efeito é

provocado na atividade das enzimas anaeróbias, aumento moderado do conteúdo de glicogênio intramuscular, aumento do número de transportadores de glicose na membrana, aumento do número de transportadores de ácidos graxos livres na membrana, melhoria no transporte iônico através de membrana e aumento da capacidade de tamponamento do músculo.

A prática do exercício diminui as concentrações do lactato sanguíneo. Lindner et al. (2001) demonstraram que, além do deslocamento para a direita da curva de lactato, à medida que ocorre melhoria do condicionamento físico em animais treinados em esteira rolante, também ocorrem modificações nas fibras musculares.

HENCKEL (1983) relata que o treinamento pode aumentar significativamente a área de corte transversal e o número médio de fibras. Admite-se que um número pequeno de fibras musculares que apresentam aumento da sua área possa fender-se ao meio, formando fibras inteiramente novas, aumentando assim, também o número de fibras (GUYTON, 2002).

### **2.7.1. O treinamento para exercício de resistência**

O efeito do treinamento sobre a composição fibrilar é variável. Alguns pesquisadores relatam que o exercício de resistência, moderado e aeróbio produz aumento da capacidade aeróbia do músculo para gerar ATP (ESSÉN-GUSTAVSSON et al., 1983; DEMIREL et al., 1999). Esta modificação ocorre mediante adaptações metabólicas fibrilares associadas ao aumento da atividade de enzimas implicadas no metabolismo oxidativo como, citrato sintetase e 3-OH-Acyl-CoA desidrogenase, além do incremento na proporção de fibras oxidativas (ESSÉN-GUSTAVSSON et al., 1983; RIVERO et al., 1999).

Quando o exercício é anaeróbio ou de força, ocorre hipertrofia fibrilar (SALTIN & GOLLNICK, 1983), embora alguns autores não tenham encontrado evidências de tal efeito (UHRIN & LIPTAJ, 1992).

Os animais submetidos ao treinamento de resistência utilizam-se mais do metabolismo aeróbio para a produção de energia, o que mostra o papel preponderante das fibras oxidativas musculares no desempenho desses animais (RONÉUS et al., 1994). Entretanto, as fibras glicolíticas também

participam desta atividade, uma vez que, à medida que o trabalho se torna mais intenso, a energia é fornecida ainda mais por meio anaeróbio (WHITE & SNOW, 1987; SCHUBACK & ESSÉN-GUSTAVSSON, 1998).

Os exercícios de resistência em cavalos traduzem uma significativa transição dos tipos de fibras de contração rápida para fibras de contração lenta (SERRANO et al., 2000). A adaptação mais comumente descrita do músculo esquelético equino para atividade neuromuscular pelo treinamento de resistência é um aumento na capacidade oxidativa e na relação histoquímica tipo IIA para tipo IIX, enquanto relatos de outras alterações de tipos de fibras particularmente aquelas relacionadas com a conversão de rápida para lenta, são raras e algumas vezes, contraditórias (SNOW & VALBERG, 1994).

Está bem documentado na literatura que, o treinamento que exige uma alta demanda metabólica aumentará a capacidade oxidativa das fibras musculares (FITTS & WIDRICK, 1996), havendo uma transformação de fibras no sentido de rápida para lenta (LIEBER, 2002).

A utilização do músculo não parece afetar a relação entre a isoforma de MyHC e velocidade de encurtamento (HARRIDGE et al., 1998), ao passo que, a utilização do músculo pode alterar a isoforma de MyHC expressada pela fibra muscular individual (ANDERSEN et al., 1994; HARRIDGE, 1996). Sendo assim, pelo aumento da atividade muscular através do treinamento de resistência ou enduro, o gene da MyHCIIx é desativado na maioria das fibras IIX, resultando em uma proporção elevada de fibras IIA em detrimento das fibras IIX ou IIAX (KLITGAARD et al., 1990; ANDERSEN et al., 1994; HARRIDGE, 1996; HARRIDGE et al., 1996).

A extraordinária capacidade do músculo esquelético adulto em estabelecer, adaptações a longo prazo para alteração nas demandas de trabalho requerem mudanças na expressão gênica, mediadas pelas alterações na taxa de transcrição de genes específicos e na taxa de síntese de proteínas específicas (GOLDSPINK et al., 1992; WILLIAMS & NEUFER, 1996).

Rose (1986), explica que, uma das maiores e mais importantes adaptações ao treinamento de resistência, é o aumento das concentrações de enzimas das vias associadas à  $\beta$  oxidação no músculo esquelético, e como

resultado tem-se o aumento da capacidade de trabalho devido à grande oxidação das gorduras e a pequena utilização de glicogênio. Entretanto, a duração do período de treinamento e a intensidade do exercício podem influenciar no perfil de atividade destas enzimas.

Lindner et al. (2003), observaram que as adaptações celulares corresponderam às alterações ultra-estruturais. Onde, estas alterações ultra-estruturais têm sido interpretadas no cavalo como indicativos de aumento na capacidade aeróbia e de melhoria da resistência.

O aumento da densidade mitocondrial no cavalo associado com diferentes tipos de treinamento configura uma relação positiva entre o número de fibras musculares com elevada capacidade oxidativa e o êxito competitivo em atividades de resistência (RIVERO, 1997).

Cavalos de resistência de elite apresentaram porcentagens mais altas de fibras do tipo I e IIA e porcentagens mais baixas de fibras do tipo IIX no músculo glúteo médio quando comparado a competidores comuns (RIVERO, 1996). As elevadas porcentagens de fibras musculares de tipo I e IIA estão relacionadas com capacidade de realização de exercícios de baixa intensidade e longa duração (RIVERO et al., 1993), ao passo que exercícios de curta duração e alta velocidade levam a elevadas porcentagens das fibras tipo II (BARREY et al., 1999).

Ao avaliar os efeitos de um programa de treinamento de resistência sobre os tipos de fibras musculares do músculo glúteo médio de equinos, por meio das técnicas de eletroforese, histoquímica, imunoistoquímica e bioquímica, Serrano et al. (2000), observaram que, após três meses de treinamento houve uma diminuição significativa das fibras tipo IIX e um aumento das fibras tipo IIA, enquanto a porcentagem de fibras tipo I não foi alterada. E, a diminuição das fibras tipo IIX foi ainda maior após oito meses de treinamento.

Em eventos de resistência humana, diversos relatos revelam uma alta proporção de fibras de contração lenta em músculos ativos em atletas competidores com desempenho superior. Ao contrário, os atletas corredores de curtas distâncias geralmente apresentam uma porcentagem maior de fibras

musculares tipo IIX em seus músculos locomotores (BLANCO & PÉREZ, 2004).

Comparada aos pequenos animais, como o rato e o camundongo, as conversões de fibras rápidas para fibras lentas são mais facilmente realizadas em grandes animais (PETTE & VBORVÁ, 1992). Pois de fato, existem importantes diferenças fisiológicas entre as espécies animais relacionadas ao tamanho corporal (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996).

Assim, a velocidade máxima de encurtamento das fibras musculares, expressando isoformas MyHC homólogas diminuem consideravelmente com o aumento do tamanho corporal (ROME et al., 1990). Estas diferenças estão apoiadas nas divergências estrutural e funcional nas isoformas de MyHC homólogas (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996).

A realização de exercícios de alta velocidade, assim como a prática de salto, requer potência, a qual está associada à presença de grandes massas musculares. Já os exercícios prolongados necessitam de oxigênio para o metabolismo energético, característica dos músculos que contêm elevada proporção de fibras pequenas (tipo I), utilizados nos exercícios prolongados. O aumento da massa muscular para se obter maior potência é decorrente do aumento do número e do tamanho das fibras. Estas alterações são controladas por fatores genéticos e pela intensidade de treinamento (LEWIS, 1995).

### **2.7.2. Alterações nas fibras musculares decorrentes da interrupção do treinamento**

A inatividade parece reverter todas as transformações sofridas pelas fibras musculares com o treinamento de resistência, aumentando assim a incidência de MyHC IIX (STARON et al., 1991; STARON & JOHNSON, 1993; ANDERSEN et al., 1996; HARRIDGE, 1996).

Andersen & Schiaffino (1997), relataram que, a análise da isoforma de MyHC expressão e transcrição de proteínas em fibras individuais mostraram indícios de uma expressão aumentada de MyHC IIX, quando o desuso ou a interrupção do treinamento foram seguidos de um período de treinamento intenso.

No estudo realizado por Andersen & Aagaard (2000), a MyHC IIX foi elevada após noventa dias de interrupção do treinamento de resistência, alcançando valores excessivos àqueles observados anteriormente. Cessado o período de treinamento, as fibras do tipo IIX podem alcançar valores ainda mais altos do que os valores alcançados antes do treinamento de resistência.

Dezenove semanas de treinamento de resistência em humanos, diminuíram a quantidade de fibras do tipo IIX e, correspondentemente, aumentaram a quantidade de fibras IIA, como avaliados pela histoquímica mATPase (HATHER et al., 1991). Entretanto, após quatro semanas de interrupção do treinamento o índice de fibras IIA/IIX não foi restabelecido (HATHER et al., 1991).

Da mesma forma, quatorze dias de interrupção do treinamento seguido do treinamento de resistência apresentado não apresentaram aumento na proporção de fibras do tipo IIX em um grupo de atletas super treinados para resistência pesada (HORTOBAGYI et al., 1993).

Não é improvável que ausência de aumento nas fibras do tipo IIX observadas nos estudos anteriormente mencionados sejam os resultados dos períodos de interrupção do treinamento de duração insuficiente (ANDERSEN & AAGAARD, 2000).

Em um estudo de treinamento prolongado, com um grupo de mulheres sedentárias submetidas a treinamento de resistência por um período de mais de vinte semanas, resultou em um desaparecimento quase que total das fibras do tipo IIX (STARON et al., 1991).

O período de treinamento foi então seguido de trinta semanas de interrupção do treinamento, após o qual, a porcentagem das fibras do tipo IIX alcançaram 24%, em comparação aos 16% observados antes do treinamento de resistência. Embora níveis de diferença estatística não fossem alcançados. Esta observação pode ser interpretada para indicar um super estímulo no volume de MyHC IIX por conta do regime de treinamento de resistência seguido pelo período de interrupção do treinamento. Consequentemente, o volume de MyHC IIX poderia, em trinta semanas de interrupção do treinamento, estar diminuída duas vezes os valores do pré-treinamento após ter pico anterior no

decorrer do período de interrupção do treinamento. Apresentando, assim, um tempo de retorno de três a quatro semanas (BATES & MILLWARD, 1983; LEWIS et. al., 1984; TERMIN & PETTE, 1992), para proteínas de isoformas de MyHC.

É provável que as alterações principais na composição de MyHC sejam devido à atividade física ou inatividade, sendo necessárias muitas semanas ou meses para as alterações na composição de MyHC serem completamente iniciadas (ANDERSEN & AAGAARD, 2000).

## **2.8. O cavalo Puro Sangue Árabe e o enduro equestre**

Os cavalos de enduro são competidores de corridas classificadas como exercício de baixa intensidade e longa duração. O primeiro percurso moderno de enduro equestre foi criado em 1955 na Califórnia, do lago Tahoe ao Auburn (100 milhas). Atualmente, muitos percursos de enduro variam dentro de uma média de 30 a 160 Km, ou 100 + 100 Km a serem percorridos em 2 dias, ou 500 Km para serem percorridos em mais de 5 dias (SOSA- LEON, 1998; DUREN, 2000).

Muitas raças de equinos têm sido testadas e utilizadas para corridas de enduro; os mais competitivos são os PSA ou Cruza Árabe, devido a sua composição miofibrilar (DUREN, 2000). Os cavalos PSA comparados aos cavalos Puro Sangue Inglês (PSI), são melhores adaptados ao exercício de enduro por causa de sua superior capacidade oxidativa (PRINCE et al., 2001).

Os PSA e Anglo-Árabes parecem ter concentrações de lactato mais baixas, comparados aos cavalos Lusitanos, em velocidades acima de 25 Km/h (CASTEJON et al., 1994), mostrando assim uma melhor adaptação para exercícios de longa distância e baixa intensidade (BERGERO et al., 2005).

Nos equinos, as diferenças individuais existentes em uma mesma raça, referentes à composição das fibras musculares, estão relacionadas com as características genéticas e fenotípicas (ESSÉN-GUSTAVSSON et al., 1980; HODGSON et al., 1986; RIVERO et al., 1993; SNOW & VALBERG, 1994;).

As variedades na composição fibrilar de músculos podem ser observadas entre as raças. Essas diferenças estão relacionadas às

características de desempenho, para as quais a raça foi selecionada. No cavalo, a distinção é mais evidente no músculo glúteo médio, um dos maiores e mais importantes músculos para a produção de força propulsora. Existem também variações na área das fibras e na capacidade oxidativa entre as raças e dentro delas (PETTE & STARON, 1997).

Cada cavalo possui propensão genética para determinado tipo de atividade, que pode ser mais bem aproveitada se houver treinamento apropriado (LEWIS, 1995). As proporções das fibras do tipo I e do tipo II são estáveis dentro de uma raça (RIVERO et al., 1989). Segundo esses mesmos autores, a proporção média das fibras do tipo II é menor nos cavalos das raças *American Trotter*, Árabe e Lusitano em relação a animais da raça Puro Sangue Inglês, os quais possuem maior aptidão atlética para exercícios de alta velocidade, como a corrida.

## **2.9. Biópsia Muscular**

A técnica de biópsia muscular por agulha percutânea é uma ferramenta útil para a avaliação do potencial atlético do cavalo, sendo já utilizada na medicina esportiva equina. Vários estudos baseados na utilização desta técnica demonstraram correlação entre o desempenho atlético e as características musculares de equinos em diferentes modalidades esportivas (ÉSSEN-GUSTAVSSON et al., 1984; RIVERO et al, 1995).

A biópsia por agulha percutânea foi introduzida por Bergström em 1962 e desde 1974 tem sido utilizada para coleta de amostra de músculo esquelético em equinos (LINDHOLM & PIEHL, 1974).

O músculo glúteo médio é o músculo mais submetido ao procedimento de biópsia muscular, pois desempenha maior atividade propulsora na locomoção e permite fácil acesso para tal procedimento (LINDHOLM & PIEHL, 1974).

LINDHOLM & PIEHL (1974) descreveram a técnica de biópsia muscular percutânea nos equinos, utilizando agulha de biópsia desenvolvida por Bergström (1962) para uso em humanos.

Da mesma maneira SNOW & GUY (1976) descreveram a técnica de biópsia muscular percutânea em equinos, destacando o avanço na utilização de agulhas de biópsia, facilitando a colheita, obtendo-se uma amostra muscular satisfatória, com o mínimo de complicações secundárias.

O uso desta técnica tornou possível a realização de análises do tecido muscular, a determinação do diagnóstico e prognóstico das doenças neuromusculares e a avaliação do condicionamento físico, bem como a compreensão das modificações adaptativas que ocorrem na musculatura esquelética durante o treinamento (WHITE & SNOW, 1987). Utilizando este método, amostras de músculo podem ser obtidas de animais vivos, possibilitando o estudo de suas características metabólicas e contráteis (SNOW & VALBERG, 1994).

O método de biópsia por agulha percutânea é a técnica mais simples e segura para obtenção e análise muscular, sendo a mais aceita pelos proprietários de animais em campanha hípica (SNOW & GUY, 1976; SNOW & VALBERG, 1994).

Para avaliações do desempenho, durante o treinamento de cavalos, são necessárias coletas de fragmentos de músculo a intervalo pré-determinado. Por essa razão, Lindner et al. (2002) coletaram fragmentos do músculo glúteo médio direito e esquerdo nas profundidades de 20 e 60 mm, utilizando a técnica descrita por LINDHOLM & PIEHL (1974).

### III. OBJETIVOS

#### Objetivo geral:

Este estudo teve por principal objetivo, avaliar o efeito do exercício sobre as fibras do músculo glúteo médio de equinos da raça PSA treinados e não treinados para enduro equestre, por meio de biópsia muscular e das técnicas histoquímicas e imunoistoquímica para a diferenciação dos tipos de fibras musculares.

#### Objetivos específicos:

Comparar o percentual, a área de corte transversal, o diâmetro maior e menor de cada tipo de fibra muscular em equinos da raça PSA treinados e não treinados para enduro equestre, por meio das técnicas histoquímica e imunoistoquímica.

Correlacionar o desempenho dos animais não treinados para enduro equestre com o perfil de fibras musculares apresentado por estes.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Neste estudo foram utilizados 36 equinos da Raça PSA, sadios de diferentes idades e ambos os sexos, pertencentes à propriedade particular de criação e treinamento de equinos. Os animais foram divididos em dois grupos distintos: Grupo 1 (G1) composto de animais jovens domados, porém não treinados para prática de enduro equestre. As amostras foram coletadas destes animais no período de doma, sem treinamento para competição de enduro equestre e, após o processamento das amostras estes animais se encontrariam em treinamento e alguns deles já em competições para enduro equestre.

O Grupo 2 (G2) foi composto de equinos adultos treinados para prática de enduro equestre, tendo já participado de competições nacionais e internacionais de enduro. A discriminação dos grupos encontra-se na Tabela 2.

**TABELA 2 –** Porcentagem individual dos tipos de fibras dos grupos G1 e G2

| G1 = NÃO TREINADOS |       |         |         |
|--------------------|-------|---------|---------|
| ANIMAL             | I (%) | IIA (%) | IIX (%) |
| 1                  | 30.79 | 55.5    | 13.68   |
| 2                  | 18.39 | 49.52   | 32.07   |
| 3                  | 18.9  | 59.79   | 21.3    |
| 4                  | 26.11 | 45.83   | 28.05   |
| 5                  | 16.92 | 50.76   | 32.3    |
| 6                  | 17.85 | 59.09   | 23.05   |
| 7                  | 14.37 | 50.65   | 34.96   |
| 8                  | 20.23 | 50.89   | 28.86   |
| 9                  | 14.33 | 49.81   | 35.84   |
| 10                 | 20.35 | 54.42   | 25.22   |
| 11                 | 22.11 | 53.33   | 24.56   |
| 12                 | 23.24 | 41.9    | 34.86   |
| 13                 | 21.28 | 43.59   | 35.13   |
| 14                 | 33.93 | 42.81   | 23.26   |
| 15                 | 25.91 | 53.02   | 21.07   |
| 16                 | 27.04 | 46.76   | 26.2    |
| 17                 | 41.69 | 40.13   | 18.18   |
| 18                 | 22.8  | 50.32   | 26.88   |
| 19                 | 19.84 | 52.92   | 27.24   |
| G2 = TREINADOS     |       |         |         |
| ANIMAL             | I (%) | IIA (%) | IIX (%) |
| 1A                 | 64.86 | 16.22   | 18.92   |
| 2A                 | 37.85 | 36.72   | 25.42   |
| 3A                 | 47.79 | 29.79   | 22.42   |
| 4A                 | 30.6  | 46.62   | 22.78   |
| 5A                 | 45.99 | 28.27   | 25.74   |
| 6A                 | 45.54 | 16.83   | 37.62   |
| 7A                 | 55.81 | 20.16   | 24.03   |
| 8A                 | 58.78 | 35.14   | 6.08    |
| 9A                 | 28.93 | 47.52   | 23.55   |
| 10A                | 32.27 | 38.02   | 29.71   |
| 11A                | 29.46 | 39.53   | 31.01   |
| 12A                | 37.16 | 28.38   | 34.46   |
| 13A                | 33.46 | 51.33   | 15.21   |
| 14A                | 53.56 | 20.23   | 26.21   |
| 15A                | 40.49 | 37.42   | 22.09   |
| 16A                | 32.05 | 43.03   | 24.93   |
| 17A                | 48    | 20.36   | 31.64   |

## 4.2. Treinamento de Enduro

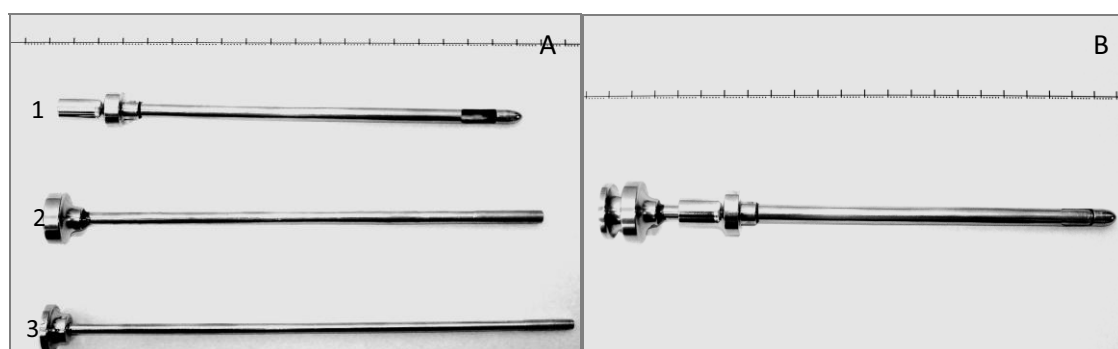
Os animais pertencentes ao G2 eram treinados 4 vezes por semana em terrenos variados como declive, plano, areia e misto, em distâncias que variam de 12 a 20 Km a uma velocidade de 12 Km/h. Em períodos de competição, uma vez por semana, o treinamento era intensificado para uma velocidade de 25 Km/h em terreno inclinado de 500m de distância, repetindo-se o exercício por uma ou duas vezes seguidas conforme velocidade de recuperação dos batimentos cardíacos.

## 4.3. Coleta das Amostras

### 4.3.1. A técnica de biópsia muscular

Uma amostra do músculo glúteo médio esquerdo de cada equino de ambos os grupos G1 e G2 foi obtida mediante biópsia percutânea por agulha tipo Bergström nº8.0.

Durante o procedimento de biópsia muscular os animais foram mantidos em posição quadrupedal sob sedação com 2 mL de acepromazina na dose de 1,1 mg/Kg em tronco de contenção específico para equinos . As colheitas foram efetuadas de acordo com a técnica descrita por Lindholm & Piehl (1974) utilizando a agulha de biópsia percutânea (Figura 1).



**FIGURA 1.** A. Agulha de biópsia percutânea do tipo Bergström nº 8.0. Composta de: 1- Corpo da agulha com janela de abertura para obtenção do fragmento muscular; 2- Cilindro cortante e 3- Mandril para remoção do fragmento muscular do interior da agulha. B. Agulha fechada, com mandril e cilindro cortante acoplados.

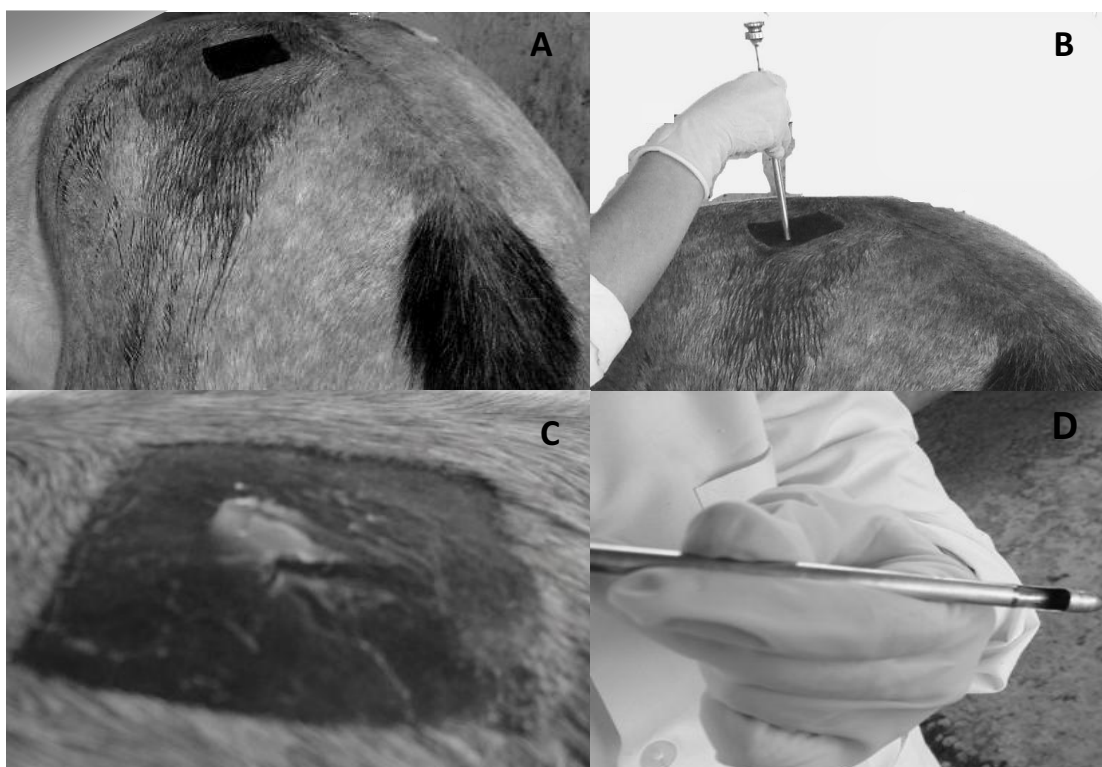
A determinação do ponto de inserção da agulha se deu de acordo Lindholm & Piehl (1974), o qual se localiza no terço médio cranial traçando-se uma linha imaginária que se estende da tuberosidade coxal até a base da cauda.

Nesta região foi realizada a tricotomia de uma área de aproximadamente 25 cm<sup>2</sup>. A antissepsia da pele foi realizada utilizando-se gaze estéril embebida em solução de iodopovidine e posteriormente embebida em solução de álcool iodado. Em seguida, foi realizado o bloqueio anestésico local, infiltrando 2 mL de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstrictor por via subcutânea. Dois minutos após a realização da anestesia local, realizou-se a antissepsia com solução de álcool-iodado e procedeu-se a incisão da pele, do tecido subcutâneo e da fáscia muscular, utilizando lâmina de bisturi descartável nº 22 seguida de hemostasia compressiva utilizando gaze estéril.

Através da incisão, a agulha acoplada ao cilindro cortante com a “janela fechada”, ambos previamente esterilizados, foram introduzidos em um ângulo de 90°, a uma profundidade de aproximadamente 9 cm no músculo glúteo médio esquerdo.

Após o posicionamento da agulha no músculo glúteo médio esquerdo, o cilindro foi levantado para abrir a “janela cortante” da agulha e procedeu-se o deslocamento lateral na agulha no interior do músculo glúteo médio esquerdo pressionando lateralmente contra a massa muscular em aproximadamente, um ângulo de 45°, e então, abaixou-se o cilindro cortante para a realização do corte do fragmento muscular.

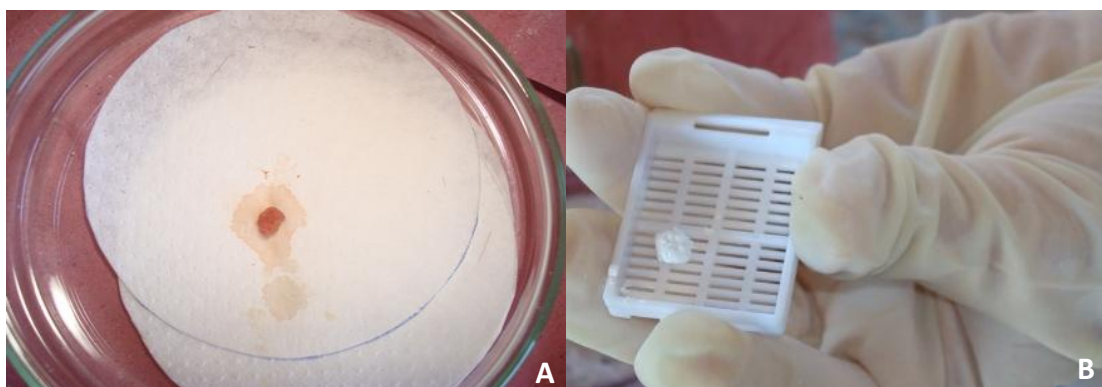
A agulha foi retirada cuidadosamente, realizou-se a hemostasia comprimindo-se manualmente a ferida cirúrgica com gaze estéril e procedeu-se a sutura simples da pele com fio de sutura Nylon - 0.0. A lesão foi tratada com pomada cicatrizante a base de neomicina e bacitracina uma vez ao dia, até a cicatrização. A sutura foi removida após 7 dias da realização da biópsia (Figura 2).



**FIGURA 2.** (A) – Determinação do ponto de perfuração e realização de tricotomia em uma área de aproximadamente 25 cm<sup>2</sup>. (B) – Inserção da agulha de biópsia após incisão da pele a uma profundidade de 9 cm. (C) – Sutura da pele com ponto simples e aplicação de pomada cicatrizante. (D) – Remoção do fragmento muscular da agulha através da janela cortante.

#### 4.4. Preparo e processamento da amostra

O fragmento muscular removido da agulha foi então mantido por alguns segundos em uma placa de Petri sob papel filtro para absorção de todo o líquido tecidual e para que cessasse todo o processo de contração muscular. Cessado o processo de contração muscular após alguns minutos, a amostra foi envolta por talco neutro, o qual exerce papel crioprotetor com o intuito de proteger a arquitetura muscular dos efeitos da congelação. Em seguida, essa amostra foi armazenada em um cassete para enfim sofrer o processo da congelação em nitrogênio líquido a -160°C em botijão apropriado, ficando ali estocada até o processamento das técnicas histológicas, histoquímicas e imunoistoquímica (Figura 3).



**FIGURA 3.** (A) - Fragmento muscular sobre papel filtro, para absorção dos líquidos tissulares e fim dos processos de contração muscular. (B) – Fragmento muscular disposto em cassete e envolto em talco neutro utilizado como crioprotetor.

Os cortes histológicos foram realizados em criostato<sup>3</sup> a -20°C a 10 µm de espessura, sendo confeccionadas 10 lâminas histológicas por animal, cada qual contendo 4 cortes transversais seriados dos fragmentos musculares provenientes da biópsia muscular.

As lâminas histológicas foram armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises musculares, para manutenção da atividade enzimática do tecido muscular, no laboratório de Endocrinologia no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-Unesp, campus Botucatu, São Paulo.

## 4.5. Técnicas Histoquímicas

### 4.5.1. Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazolium

#### Redutase (NADH-*tr*)

A reação para NADH-*tr* foi realizada para determinar a capacidade oxidativa dos diferentes tipos de fibras musculares de equinos, adaptada de Dubowitz et al. (1985). Onde, foi utilizada, a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH), como marcador do padrão oxidativo. A técnica consistiu em incubar a amostra muscular em solução que contém a enzima NADH e NBT (Nitro Blue Tetrazolium) para formar o complexo NADH-*tr*.

---

<sup>3</sup> Leica CM 1850

As lâminas contendo os cortes musculares foram mantidas à temperatura ambiente durante 20 minutos, para secagem e aderência dos cortes na lâmina histológica. Os cortes foram incubados durante 30 minutos em estufa a 37°C em solução contendo 8 mg de NADH-tr<sup>4</sup>, 10 mg NBT<sup>5</sup> e 10 mL de tampão Tris 0,2M pH 7,4 (1,2114g Tris em 50 mL de água destilada). Em seguida, foram lavados em água destilada três vezes. Posteriormente, foram fixados em formol a 5% tamponado pH 7,0, durante cinco minutos. Seguido de lavagem em água destilada, desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem com resina sintética.

#### 4.5.2. Adenosina Trifosfatase Miofibrilar (mATPase)

As lâminas contendo os cortes musculares foram submetidas à reação da histoquímica mATPase procedendo-se à preparação de uma solução (A), composta por Amortecedor Glycina<sup>6</sup> 0.1 M a qual tem a composição de 0,75 g Glycina<sup>6</sup> + 0,585 g NaCl em 100 mL de água destilada e, a preparação de uma solução (B), que compõe-se de 50 mL da solução (A) adicionado de 10mL água destilada + CaCl<sub>2</sub> 0.75M (11,03g CaCl<sub>2</sub> em 100mL de água destilada). Ajusta-se o pH a 9.8 com NaOH (1N). Sobre esta solução (A) + (B) adiciona-se ATP<sup>7</sup>, ajusta-se novamente o pH para 9.8. As lâminas foram incubadas na solução de ATP por 15 minutos em estufa a 37°C. Após o tempo decorrido, os cortes foram lavados em água destilada e imersas em CoCl<sub>2</sub> a 2% por 5 minutos e lavadas com água destilada. Depois de lavadas foram imersas em sulfeto de amônia 1:10 por 30 segundos e lavadas com água destilada e desidratadas em séries crescentes de etanol (70, 80, 90, 100 e 100%), diafanizados em três séries de xilol a 100% e montados em laminulas em resina sintética.

---

<sup>4</sup>  $\beta$  Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form ( $\beta$ NADH) Dissodium Salt – N- 8129 – SIGMA

<sup>5</sup> NBT – Nitro Blue Tetrazolium – N – 6876 - SIGMA

<sup>6</sup> Glicina – G7126 - SIGMA

<sup>7</sup> ATP – Adenosina Tri Phosfato - A2383 - SIGMA

#### 4.6. Técnica Imunoistoquímica

As lâminas contendo os cortes musculares foram submetidas à reação de imunoistoquímica de dupla marcação, utilizando-se *kit* de dupla marcação *EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit / Mouse (DAB + / Permanent Red) K5635*, com o uso dos anticorpos monoclonais primários *M 8421 Sigma* anti-MyHC de contração lenta e *M 4276 Sigma* para coloração de fibras contendo MyHC de contração rápida.

As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente, onde receberam 10 banhos de água deionizada e 2 banhos de tampão TRIS pH 7.4. O procedimento de imunoistoquímica de dupla marcação seguiu as orientações contidas no *kit* de dupla marcação, onde a primeira incubação se deu com o anticorpo primário contra cadeia pesada de miosina lenta *M 8421* na diluição de 1: 4000 por 2 horas em estufa a 27°C e, a segunda incubação se deu com o anticorpo contra cadeia pesada de miosina rápida *M 4276* na diluição de 1: 800 por 2 horas em estufa a 27°C.

#### 4.7. Análises Morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas no laboratório de Análises de Imagens do Departamento de Clínica no serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp campus de Botucatu-SP, conforme os parâmetros considerados por SERRANO et al. (1996).

Dois cortes histológicos corados mediante as técnicas histoquímicas foram digitalizados em campos idênticos a partir da realização de fotomicrografias de cada secção utilizando o sistema de processamento de imagens *Leica Qwin* computadorizado equipado com microscópio *Leica DMR* acoplado a câmara de alta resolução *Leica DFC 500*.

Foram obtidas a frequência e área média de secção transversal de cada tipo de fibra. A frequência média foi considerada como a porcentagem do número total de fibras. A área média de secção transversal das fibras foi medida em  $\mu\text{m}^2$ , a partir da mensuração de cada tipo de fibra muscular, assim como o maior e o menor diâmetro das mesmas. Foram mensuradas aproximadamente 200 fibras por amostra.

## V. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O procedimento estatístico foi realizado por meio da técnica da análise da variância não paramétrica em grupos independentes, complementada com o teste de *Dunn*, considerando o nível de 5% de significância (ZEAR, 1999), (tabela 3)

E, por meio da técnica da análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparação de múltiplas de *Bon Fenoni*, considerando o nível de 5% de significância (ZEAR, 1999), (tabela 4).

## VI. RESULTADOS

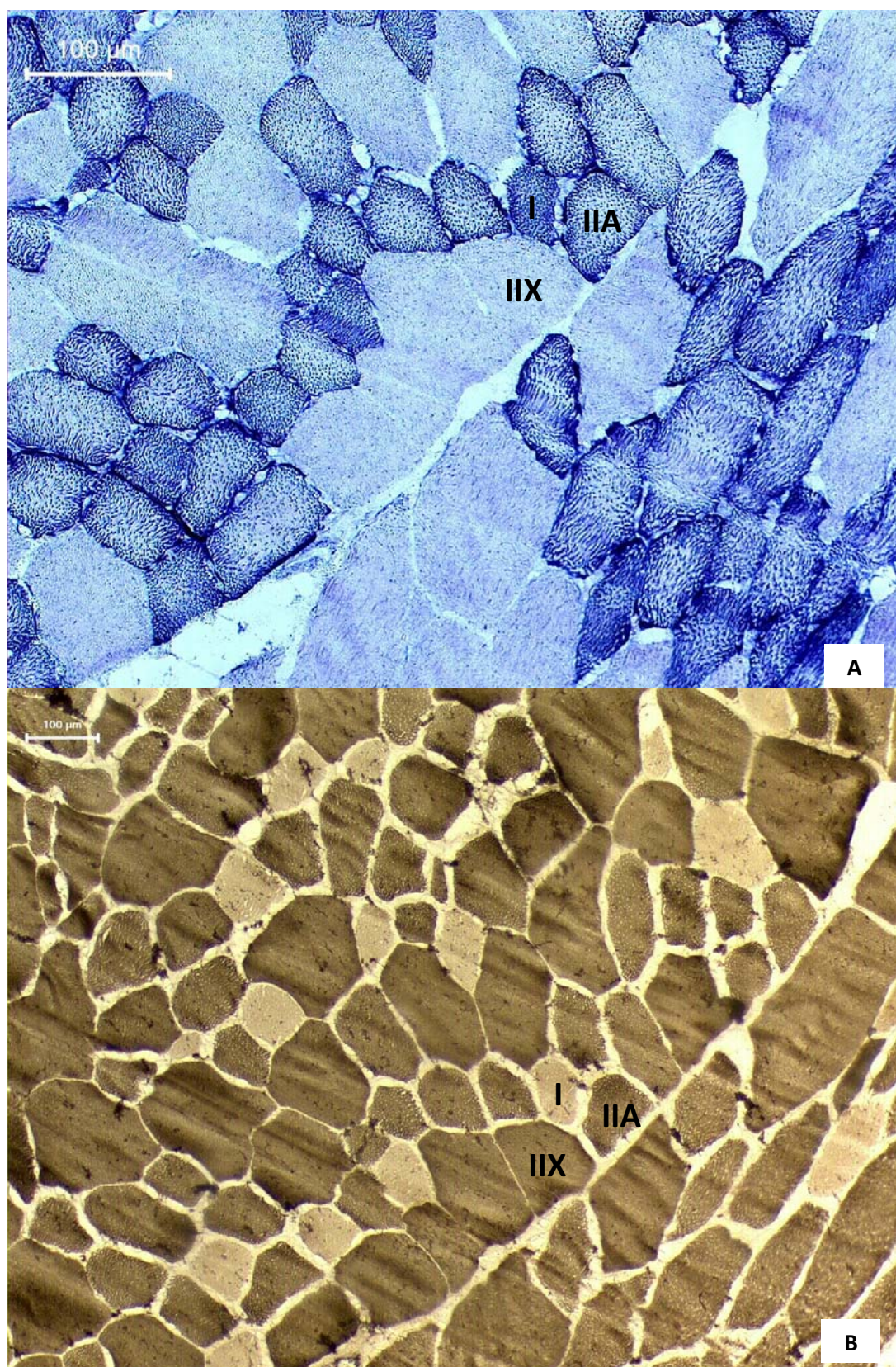
### 6.1. Análises histoquímicas

#### 6.1.1. Avaliação da capacidade oxidativa das fibras musculares

As fibras oxidativas, também chamadas fibras do tipo I apresentaram reação intensa, com uma coloração azul escura. As fibras glicolítico-oxidativas, também chamadas IIA apresentaram reação alta-intermediária, com uma coloração azul média e, as fibras de metabolismo glicolítico, as chamadas fibras IIX, apresentaram baixa reatividade ao NADH-*tr* revelando uma coloração azul bem claro (Figura 4A).

#### 6.1.2. Atividade de mATPase pH 9.8

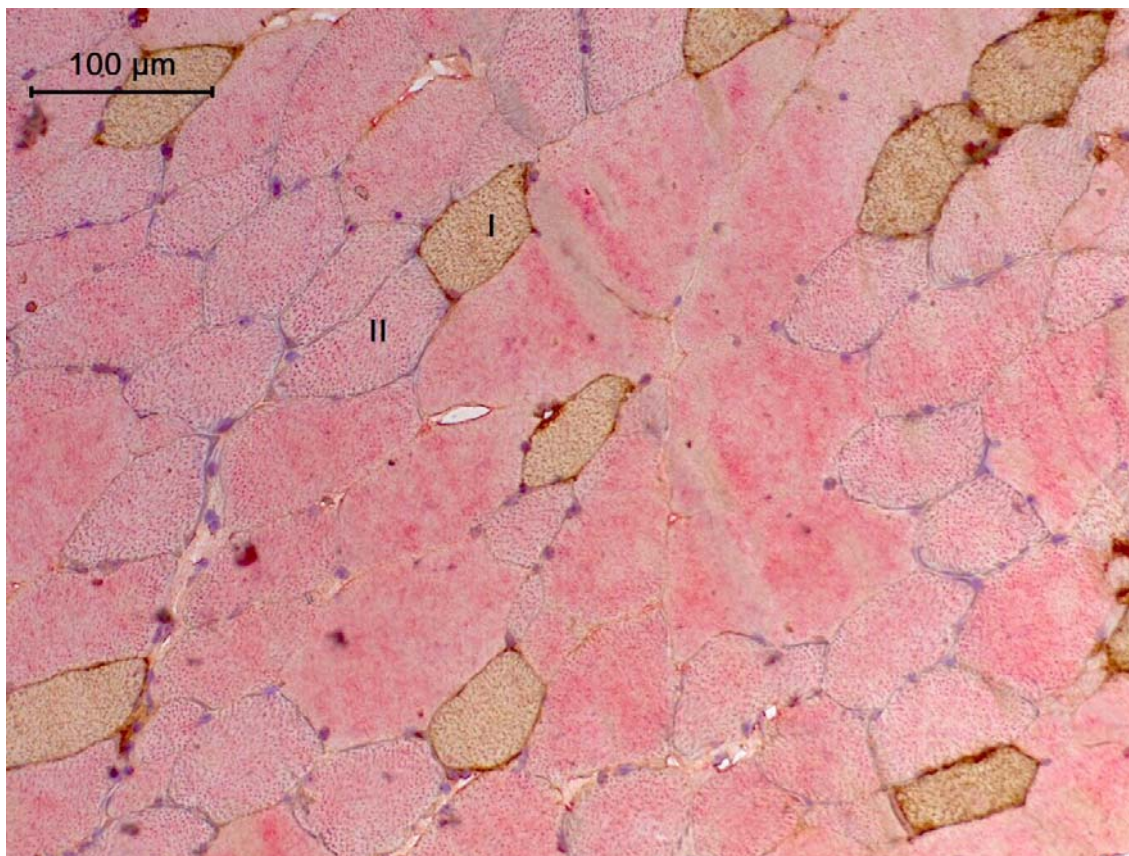
Pela atividade da mATPase pH 9.8 foi possível diferenciar as fibras musculares por meio da coloração castanho intenso para as fibras de MyHC II e castanho claro para as fibras de MyHC I. Os cortes processados para esta técnica foram comparados aos cortes processados para a histoquímica NADH-*tr* para a identificação dos 3 tipos de MyHC puras presentes no músculo esquelético dos equinos, sendo elas I, IIA e IIX (Figura 4B).



**FIGURA 4.** (A) – Corte transversal músculo glúteo médio de equinos, corado pela técnica histoquímica NADH-TR. (B) - Corte transversal músculo estriado esquelético corado pela técnica histoquímica mATPase. Observar os campos microscópicos idênticos em aumento de 200x, com o padrão mosaico clássico.

## 6.2. Imunoistoquímica

O uso da técnica de imunoistoquímica de dupla marcação possibilitou uma diferenciação restrita nos tipos de fibras musculares, uma vez que os anticorpos monoclonais utilizados são específicos para MyHC I e MyHC II, não possibilitando a subdivisão entre MyHC IIa e MyHC IIx, portanto, a diferenciação celular se deu entre as fibras do tipo I com coloração castanho e tipo II com coloração rósea, na grande maioria dos cortes musculares analisados, pois, em alguns dos cortes foi possível a visualização de fibras com duas tonalidades de rosa diferentes nas fibras do tipo II (Figura 5).



**FIGURA 5.** Corte transversal do músculo Glúteo médio de equinos submetido à reação de imunoistoquímica de dupla marcação para a diferenciação das fibras de MyHC I e MyHC II.

### 6.3. Morfometria

#### 6.3.1. Percentual dos tipos de fibras musculares

Com relação à distribuição dos tipos de fibras musculares, comparado ao G2, as fibras do tipo IIA do G1 tiveram frequência significativamente mais alta do que as fibras dos tipos I e IIX ( $P < 0,005$ ). E no G2, as fibras do tipo I tiveram frequência significativamente mais altas do que as fibras do tipo IIX ( $P < 0,005$ ). Os dados da porcentagem dos tipos de fibras encontram-se na Tabela 3.

**TABELA 3** Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem das fibras musculares segundo grupo e tipo

|         | Tipo de Fibra                     |                                   |                      | Valor P     |
|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------|
|         | I                                 | IIA                               | IIX                  |             |
| G1      | 21,28 (14,33; 41,69)*             | 50,65 (40,13; 59,79) <sup>Δ</sup> | 26,88 (13,68; 35,84) | $P < 0,001$ |
| G2      | 40,49 (28,93; 64,86) <sup>#</sup> | 35,14 (16,22; 51,33)              | 24,93 (6,08; 37,62)  | $P < 0,05$  |
| Valor P | $P < 0,001$                       | $P < 0,001$                       | $P > 0,05$           |             |

\*( $P < 0,05$ ) I vs IIA / #( $P < 0,05$ ) I vs IIX /  $Δ$  ( $P < 0,05$ ) IIA vs IIX

#### 6.3.2. Percentuais estabelecidos pelas técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas

As porcentagens das fibras dos tipos I e II detectadas pelas técnicas histoquímicas e imunoistoquímica nos grupos G1 e G2 encontram-se na Tabela 4.

**TABELA 4.** Porcentagens das fibras musculares dos tipos I e II detectadas pelas técnicas histoquímicas mATPase e NADH-tr e imunoistoquímica com anticorpo anti-MyHC nos grupos G1 e G2

|    | Histoquímica com mATPase e NADH-tr |        | Imunoistoquímica com anticorpo anti-MyHC |        |
|----|------------------------------------|--------|------------------------------------------|--------|
|    | I (%)                              | II (%) | I (%)                                    | II (%) |
| G1 | 21,85                              | 78,14  | 16,56                                    | 83,44  |
| G2 | 50,69                              | 49,31  | 47,11                                    | 52,89  |

### 6.3.3. Média da área de secção transversal, diâmetros maior e menor das fibras musculares

Com relação à média da área de corte transversal, as fibras do tipo IIX foram significativamente maiores tanto no G1, quanto no G2, comparada às médias das áreas das fibras dos tipos I e IIA ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os diâmetros das fibras musculares (Tabela 5).

**TABELA 5.** Média e desvio padrão das variáveis segundo grupo e tipo de fibra

| Variável       | Grupo | Tipo de Fibra                   |                                |                   | Valor P    |
|----------------|-------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------|------------|
|                |       | I                               | IIA                            | IIX               |            |
| Área           | G1    | 1660,87 ± 307,24 <sup>*#</sup>  | 2445,34 ± 498,08 <sup>Δ</sup>  | 4533,68 ± 915,12  | $P < 0,05$ |
|                | G2    | 3285,98 ± 1208,60 <sup>*#</sup> | 4558,33 ± 1655,52 <sup>Δ</sup> | 5933,67 ± 2128,71 | $P < 0,05$ |
| Valor P        |       | $P < 0,001$                     | $P < 0,001$                    | $P < 0,05$        |            |
| Diâmetro Maior | G1    | 676,42 ± 83,3                   | 681,10 ± 72,76                 | 697,77 ± 95,57    | $P > 0,05$ |
|                | G2    | 679,99 ± 58,86                  | 669,57 ± 66,59                 | 701,18 ± 81,32    | $P > 0,05$ |
| Valor P        |       | $P > 0,05$                      | $P > 0,05$                     | $P > 0,05$        |            |
| Diâmetro Menor | G1    | 478,82 ± 43,22                  | 505,99 ± 61,40                 | 499,28 ± 50,69    | $P > 0,05$ |
|                | G2    | 517,45 ± 49,37                  | 498,10 ± 47,01                 | 507,87 ± 96,45    | $P > 0,05$ |
| Valor P        |       | $P > 0,05$                      | $P > 0,05$                     | $P > 0,05$        |            |
| Relação        | G1    | 1,42 ± 0,20                     | 1,38 ± 0,21                    | 1,41 ± 0,20       | $P > 0,05$ |
| Dmaior/dmenor  | G2    | 1,36 ± 0,20                     | 1,30 ± 0,16                    | 1,44 ± 0,35       | $P > 0,05$ |
| Valor P        |       | $P > 0,05$                      | $P > 0,05$                     | $P > 0,05$        |            |

### 6.4. Capacidade Oxidativa

As áreas médias relativas das fibras dos tipos I e IIA foram maiores nos equinos do G2, correspondendo a 57% da área total da amostra avaliada contra 47,5% do G1 (Tabela 6).

**TABELA 6.** Média e desvio padrão da área relativa de corte transversal (%CSA) dos tipos de fibras do músculo glúteo médio de equinos PSA dos grupos G1 e G2

| Grupo   | I                      | IIA                    | IIX                    | P value |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|---------|
| G1      | 19.3±0.7 <sup>aA</sup> | 28.3±0.7 <sup>aB</sup> | 52.4±0.7 <sup>aC</sup> | <0.0001 |
| G2      | 23.8±0.7 <sup>bA</sup> | 33.0±0.7 <sup>bB</sup> | 43.3±0.7 <sup>bC</sup> | <0.0001 |
| P value | <0.0001                | <0.0001                | <0.0001                | -       |

<sup>a-b</sup> Sobrescritos incomuns na mesma coluna diferem (P<0.05).

<sup>A-C</sup> Sobrescritos incomuns na mesma linha diferem (P<0.05).

### 6.5. Desempenho atlético dos equinos PSA pertencentes ao grupo não treinado

Após a realização do procedimento de biópsia muscular e obtenção de amostras musculares, os animais do G1 passaram então a ser treinados e competirem na modalidade de enduro equestre. A avaliação do desempenho atlético e a porcentagem das fibras musculares de parte desses animais encontra-se na Tabela 7.

**TABELA 7** Avaliação de desempenho de parte dos animais do G1 e a porcentagem das fibras musculares

| Desempenho | Animal | I (%) | IIA (%) | IIX (%) |
|------------|--------|-------|---------|---------|
| Excelente  | 1      | 30,79 | 55,55   | 13,68   |
|            | 9      | 14,33 | 49,81   | 35,84   |
|            | 13     | 21,28 | 43,59   | 35,13   |
| Muito Bom  | 3      | 18,90 | 59,79   | 21,30   |
|            | 4      | 26,11 | 45,83   | 28,05   |
|            | 8      | 20,23 | 59,89   | 28,86   |
|            | 14     | 33,93 | 42,81   | 23,26   |
| Bom        | 5      | 16,92 | 50,76   | 32,30   |
|            | 12     | 23,24 | 41,49   | 34,86   |
|            | 18     | 22,80 | 50,32   | 26,88   |
| Regular*   | 10     | 20,35 | 54,42   | 25,22   |
|            | 15     | 25,91 | 53,02   | 21,07   |
|            | 16     | 27,04 | 46,76   | 26,20   |
|            | 17     | 41,69 | 40,13   | 18,18   |

\*Os animais que apresentaram desempenho regular não foram submetidos ao esforço máximo, pelo fato de serem animais ainda muito jovens.

## VII. DISCUSSÃO

Como já descrito em estudos prévios de treinamento de equinos, o músculo glúteo médio é o mais frequentemente biopsiado. Esses estudos estão baseados em análises de um único fragmento de biópsia, corado por meio da tradicional histoquímica ATPase miofibrilar. A informação baseada na análise de um único fragmento de biópsia deste músculo exige que, o procedimento seja adequadamente monitorado para não ocorrer erros na análise. De fato, os estudos revelam que o músculo glúteo médio dos cavalos é um músculo heterogêneo em que, os tipos de fibras, composição de MyHC, tamanho da fibra, capilares e perfil metabólico mudam de forma dramática de acordo com a profundidade (RIVERO et al., 1995; SERRANO et al., 1996).

Por este fato, as amostras foram colhidas da região profunda do músculo glúteo médio, alcançando 9 cm de profundidade. Tendo em vista que Serrano & Rivero (2000) afirmam que, o treinamento para enduro equestre requer um maior recrutamento das fibras dos tipos I e IIA, que se encontram em maior concentração no compartimento profundo do músculo glúteo médio. Nesse sentido as adaptações das fibras musculares podem ser confiavelmente avaliadas pela obtenção de fragmentos do compartimento profundo do músculo glúteo médio.

A diferença sistemática e significativa na porcentagem nos tipos de fibras presentes entre os compartimentos profundo e superficial do músculo glúteo médio se deve ao fato de que, este músculo possui duas regiões anatômicas distintas, dorsal e ventral, separadas pela fáscia muscular, e diferenciada pela arquitetura e padrões de inervação (BRUCE & SCHURG, 1990).

Dos estudos disponíveis, existe a evidência de que a distribuição regional dos tipos de fibras e tamanhos das fibras dentro de um músculo parece refletir interrelações entre estrutura e função (ARMSTRONG & PHELPS, 1984; BREDMAN et al., 1990).

A distribuição dos tipos de fibra no músculo glúteo médio indica uma diferenciação funcional do músculo. A região profunda do músculo parece ser

mais adequada para a manutenção da postura, como também para a realização de exercício de baixa intensidade nas atividades de longa duração. É de conhecimento geral, que o tamanho da fibra muscular está relacionado ao uso do músculo, onde, se observa o aumento do tamanho da fibra com o treinamento (RIVERO et al., 1992), e a diminuição do tamanho da fibra com a inatividade (NICKS et al., 1989).

Como os compartimentos superficial e profundo do músculo glúteo médio são utilizados durante o movimento, as demandas funcionais diferem na população de fibras, e estas desenvolvem propriedades metabólicas condizentes com a modalidade esportiva desempenhada. Assim, o treinamento de enduro determina um aumento na proporção das fibras do tipo I na região profunda do glúteo médio que passam a ser de maior porcentagem resultando ainda no aumento no tamanho das fibras, como observado em Rivero et al. (1992).

Os resultados do presente estudo mostraram que nos animais do grupo não treinado (G1) o maior percentual de fibras foi do tipo IIA; e no grupo treinado (G2) foi do tipo I. Estes dados estão de acordo com a afirmação de que, após 8 meses de treinamento de resistência em equinos, a frequência das fibras do tipo I aumenta e a das fibras do tipo IIX diminui Serrano & Rivero (2000).

Ao contrário, a distribuição e o tamanho dos tipos de fibra da região superficial do músculo glúteo médio indica um padrão de uso completamente diferente, pois esta região do músculo parece estar mais envolvida com geração de força propulsora, rápida e de curta duração (RIVERO et al., 1992).

Foram realizados numerosos estudos tendo como base e objeto o treinamento de resistência em equinos, os quais revelaram aumento na frequência das fibras do tipo IIA e por consequente, revelou-se a diminuição das fibras do tipo IIX (ESSÉN-GUSTAVSSON & LINDHOLM, 1985; ESSÉN-GUSTAVSSON et al., 1989; RIVERO et al., 1989; 1991; 1995; RIVERO, 1996).

Ao contrário do que acontece nos treinamentos de baixa intensidade e longa duração, nos treinamentos de alta intensidade e de curta duração em

equinos, pode ser verificado a diminuição das fibras do tipo I e o aumento das fibras do tipo IIX (LOVELL & ROSE, 1991; RIVERO et al., 2002).

As transformações dos tipos de fibras de rápida para lenta induzidas pelo treinamento, também foram descritas em estudos de grandes mamíferos incluindo o homem (PETTE, 1998).

Os dados apresentados neste trabalho confirmam idéia de que, o treinamento de enduro induz a uma mudança na direção IIX  $\rightarrow$  IIA  $\rightarrow$  I. Esta atividade depende de alterações no aparato contrátil, estando bem coordenado com modificações concomitantes no perfil metabólico do músculo. Além disso, existe uma relação dose e resposta do estímulo, ou seja, do treinamento, e a magnitude das modificações provocadas no músculo.

O treinamento para exercícios de enduro a longo prazo em equinos parece provocar uma significativa transição de rápida para lenta dos tipos de fibra baseado na miosina (SERRANO et al., 2000). Tendo em vista que, este tipo de treinamento parece provocar uma supressão da expressão da MyHC IIX associada a uma super expressão concomitante da MyHC IIA, como visto em outras espécies com diferentes estilos de treinamento (ADAMS et al., 1994; STARON et al., 1994; KADI et al., 1999; SERRANO et al., 2000).

De fato, o RNAm da MyHC IIX tem uma baixa regulação durante a fase curta de treinamento de exercício orientado para enduro em músculo esquelético humano após repetidas atividades contráteis (O'NEIL, 1999). O RNAm da MyHC IIA é altamente regulado de forma simultânea com este tipo de exercício (GOLDSPINK et al., 1992; WILLIAMS & NEUFER, 1996; GOLDSPINK, 1998). Além disso, transições dos tipos de fibra IIX para IIA induzidas pelo treinamento também têm sido extensivamente descritas nos estudos de cavalos com base na ATPase miofibrilar (SNOW & VALBERG, 1994).

É necessário debater se, o treinamento de enduro dentro do âmbito fisiológico real, induz a uma verdadeira transformação MyHC II  $\rightarrow$  MyHC I no músculo esquelético de mamíferos (BROOKE & KAISER, 1970; PETTE 1998).

Deve-se considerar que, aumentando a duração total do treinamento eleva-se a magnitude da alteração de rápida para lenta no fenótipo da MyHC (DEMIREL et al, 1999; SERRANO et al., 2000).

Enfatizando que, desta forma, é aceitável assumir que a transição dos tipos de fibras com o treinamento ocorre de uma maneira graduada e sequencialmente ordenada, indo de isoformas de MyHC mais rápidas para mais lentas, ex: IIX  $\rightarrow$  IIA  $\rightarrow$  IIA  $\rightarrow$  IIA + I  $\rightarrow$  I (PETTE & STARON, 1997).

Assim, uma fibra do tipo IIX transformando-se em uma fibra do tipo I não muda diretamente da MyHC IIX para MyHC I, mas expressará MyHC IIA antes da MyHC I. Estas observações podem ser explicadas mais facilmente através da transição IIX  $\rightarrow$  IIA durante a fase inicial do treinamento, e mais adiante a transição IIA  $\rightarrow$  I durante a fase mais prolongada de treinamento (SALMONS, 1994). Todavia, a transição IIX  $\rightarrow$  IIA também ocorre durante fase prolongada de treinamento, por conta de uma diminuição adicional significativa da MyHC IIX (SERRANO et al., 2000).

Essas alterações podem ser explicadas pelo incremento das fibras musculares com tendência ao metabolismo aeróbio, em razão da transformação das fibras do tipo IIX em IIA e IIA em I (ESSÉN-GUSTAVSSON e LINDHOLM, 1985; RIVERO et al., 1993; BALDWIN & HADDAD, 2001; LEFAUCHER, 2001).

A troca de isoformas na transformação muscular conduz para uma população de fibras híbridas expandida. Assim, a coexistência de mais do que duas isoformas de MyHC na mesma fibra foi frequente após o treinamento, como descrito no estudo realizado por Serrano et al. (2000) onde, dos dados observados é razoável assumir que, uma fibra pura é capaz de completar uma transformação de rápida para lenta em resposta a um longo estímulo de treinamento de enduro.

Esta sequência de transições de MyHC correspondem a uma ordem definida pelas propriedades funcionais convertidas, como a velocidade de encurtamento, tensão de encurtamento e ativação de elasticidade (SALMONS, 1994; SCHIAFFINO & REGIANI, 1996). Assim, as fibras do tipo IIX possuem a

maior velocidade de encurtamento e tensão de encurtamento, as fibras do tipo IIA são intermediárias e as fibras do tipo I as mais lentas.

É bem conceituado que, a transição sequencial de uma isoforma de MyHC para a próxima pode ser ditada pela requisição energética (PETTE & STARON, 1997). Portanto, o potencial energético do músculo poderia desempenhar um papel regulatório na determinação do perfil de isoformas de MyHC. O desequilíbrio entre a requisição energética e o suprimento energético pode representar um sinal e disparar um ajuste apropriado na expressão de isoforma de MyHC (BOOTH & BALDWIN, 1996; PETTE & STARON, 1997).

Em contrapartida, os exercícios de alta intensidade e baixa duração, como o hipismo clássico, desempenhado por equinos da raça Brasileiro de Hipismo, as fibras do tipo IIX foram encontradas em maior porcentagem do que as fibras do tipo IIA e ainda, em menor porcentagem foram encontradas as fibras do tipo I no músculo glúteo médio (D'ANGELIS et al., 2006).

Os cavalos das raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês e Trotador Americano, que desempenham velocidades mais rápidas têm, de certa forma, mais fibras do tipo II, do que cavalos que desempenham velocidades mais baixas como o PSA e o Lusitano, embora, todos estes cavalos tenham uma alta proporção de fibras do tipo II (KARLSTRÖM, 2009).

Os percentuais dos tipos de fibras musculares I e II estabelecidos pelas técnicas histoquímicas e imunoistoquímica do presente estudo foram equivalentes, tanto no grupo de animais treinados, quanto dos animais não treinados.

A imunoistoquímica permite uma quantificação mais exata das fibras musculares corrigindo erros que são produzidos ao utilizar a técnica histoquímica na classificação de fibras híbridas e tipo IIB (ISLAS et al., 2001).

Além disso, estudo longitudinal de treinamento envolvendo seres humanos e roedores, Booth & Baldwin (1996) sugerem que, as mudanças no fenótipo MyHC, quando analisado pela eletroforese e/ou imunoistoquímica, são mais tênues do que aquelas na distribuição histoquímica do tipo de fibra, e provavelmente envolve transformações ou entre as MyHC mais rápidas ou a transformação dos tipos de fibra.

Os resultados de Serrano et al. (1996) mostram claramente a existência de três diferentes isoformas de MyHC no músculo glúteo médio de equinos e que, os tipos de fibras e as isoformas estão heterogeneamente distribuídas dentro do músculo. A distribuição de MyHCs de fibras de contração lenta e de contrações rápidas entre as fibras determinadas pela imunoistoquímica correspondem com as fibras dos tipos I e II identificadas histoquimicamente.

As técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas além da eletroforese aplicadas ao músculo esquelético de cavalos estabeleceram uma relação entre a atividade qualitativa miofibrilar de mATPase e o conteúdo da cadeia pesada de miosina. Entretanto, uma alta porcentagem de fibras do músculo glúteo médio equino tipificadas de acordo com o método de mATPase tradicional, nem sempre corresponde à classificação baseada nas isoformas de cadeia pesada de miosina. Isso indica que a ATPase é um indicador não só da cadeia pesada de miosina mas também de outras características das proteínas miofibrilares (RIVERO et al., 1996).

A histoquímica e a imunoistoquímica utilizadas como técnicas complementares entre si permitem verificar se os resultados obtidos na tipificação das fibras musculares estão corretos, por meio do percentual dos tipos de fibras encontrados com a utilização de histoquímica com os conquistados com o uso da técnica de imunoistoquímica.

Quando analisamos a área média das fibras do tipo I, IIA e IIX notamos que seus valores foram maiores nos equinos treinados (G2) quando comparado com aqueles em início de treinamento (G1). No entanto para as fibras IIX, a área total ocupada por essas fibras, no músculo glúteo médio, diminuiu nos animais em competição, indicando maior recrutamento de fibras com maior capacidade oxidativa. A maior área ocupada pela soma das áreas média relativa das fibras I e IIA (57%) e a menor área ocupada pelas IIX (43.1%) indica maior capacidade oxidativa do músculo glúteo médio dos cavalos em competição (G2) avaliados nesse estudo. As fibras musculares são recrutadas em uma ordem específica, sendo no caso de treinamento de resistência, as fibras I e IIA recrutadas primeiro que e as IIX. Entretanto com o aumento da intensidade e duração do exercício, as fibras IIX também começam

a ser recrutadas e moduladas para apresentarem maior capacidade oxidativa. Dessa forma as fibras IIX apresentariam maior resistência à fadiga, sendo de grande importância para o sucesso no enduro. Segundo Karlström *et al* (2009) a vantagem na diminuição do tamanho da fibra IIX e pela maior facilidade de aporte de nutrientes e remoção de metabolitos.

Os resultados apontados neste trabalho, estão em conformidade com os resultados obtidos por Gondin *et al.* (2005), onde, as fibras do tipo IIX apresentaram área de secção transversal significativamente maior do que as fibras do tipo IIA, a qual apresentou área de secção transversal maior do que as fibras do tipo I entre os grupos de equinos não treinados e treinados para enduro equestre.

Esta afirmativa de que, as fibras do tipo IIX possui maior área de secção transversal do que as fibras do tipo IIA no músculo glúteo médio é considerada verdadeira, afirmada por Éssen & Gustavsson *et al.* (1989). Assim, este fato ocorre tanto em equinos sem treinamento prévio, como nos submetidos ao treinamento (RIVERO *et al.*, 1999; SERRANO & RIVERO, 2000).

Snow & Valberg (1994), afirmam que, a resposta adaptativa do músculo esquelético do equino para exercício de enduro a curto e a longo prazo assumem um papel (uma função) com remodelamento mínimo, caso ocorra hipertrofia da fibra muscular, nas quais miofibras alteram significativamente seus fenótipos de MyHC, propriedades metabólicas e capilarização. Entretanto, a hipertrofia seletiva do tipo de fibra IIA foi observada como uma adaptação primária para o treinamento de enduro. Mas, diferenças significativas não foram observadas após este período. Este tipo de hipertrofia pode ser parcialmente explicada por uma conversão dos tipos de fibras na direção IIX→ IIA, já que o tipo de fibra IIX ocupa uma área maior do que a das fibras do tipo IIA. Assim, uma fibra do tipo IIX transformando-se em uma fibra do tipo IIA após um curto período de treinamento será maior do que uma fibra do tipo IIA não atingida pelo treinamento. Entretanto, a hipertrofia precoce das fibras do tipo IIA com treinamento de enduro em cavalos já está bem documentada.

Estudo tendo como objeto garanhões da raça Lusitano apresentou como resultado a hipertrofia das fibras do tipo IIA na realização de treinamento de enduro no período de três meses. Afirmam os autores deste estudo que este tipo específico de hipertrofia decorre da conversão de fibras IIX em IIA, uma vez que as fibras IIX são de maior tamanho do que as fibras do tipo IIA (SERRANO & RIVERO, 2000).

Rivero et al. (1995), em amostras colhidas utilizando a profundidade de 6 cm do glúteo médio em equinos PSA submetidos a treinamentos de resistência por três meses, constataram hipertrofia das fibras dos tipo I e IIA. E identificaram que os animais, que possuíam maior porcentagem e áreas das fibras dos tipos I e IIA tiveram melhor resposta nos testes ergométricos.

Cavalos participantes de enduro com excelente condicionamento físico apresentaram elevada porcentagem de fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo e, com maior área do que a encontrada em cavalos considerados com desempenho físico moderado (RIVERO et al., 1993).

Martins et al. (2007) avaliaram o treinamento de resistência em equinos PSA com duração de sete semanas, e verificou as modificações nas propriedades contráteis e metabólicas do músculo glúteo médio. Modificações estas, que resultaram em aumento da capacidade oxidativa das fibras musculares a partir do aumento na proporção das fibras tipo IIA em detrimento das fibras tipo IIX; do aumento da área relativa ocupada pelas fibras oxidativas (I + IIA) e da diminuição da área ocupada pelas fibras glicolíticas (IIX). As fibras musculares apresentaram diferenças quanto a porcentagem da área ocupada por cada uma, este percentual foi identificado na seguinte proporção, considerando da maior para a menor: IIX>IIA>I e IIA>IIX>I antes e após o treinamento. E, a soma da área ocupada pelas fibras I e IIA indicou o resultado de 64,9 e 77,6% tanto nos períodos pré e pós-treinamento, indicando melhora na capacidade oxidativa do músculo.

No estudo realizado por D'Angelis et al. (2005), em relação ao treinamento aeróbio em equinos PSA, com duração de 90 dias utilizando 80% do Vlac4 (velocidade em que a concentração de lactato sanguíneo atingiu 4 mmol/L), verificaram que não ocorreu alteração expressiva na frequência das

fibras dos tipos I e IIA, todavia observaram uma redução significativa na porcentagem das fibras do tipo IIX e constataram que ocorreu hipertrofia das fibras do tipo I, IIA e IIX, e aumento da área relativa das fibras do tipo I.

Serrano et al. (2000) demonstraram que, área de corte transversal de todos os tipos de fibras foram significativamente diferentes em cada um dos fragmentos obtidos dos animais do grupo pré-treinamento. As fibras do tipo I tiveram aumento da área de corte transversal. A fibra intermediária do tipo IIA e, a fibra do tipo IIX (incluindo a híbrida IIXA) tiveram a área de corte transversal diminuída. Diferenças não significativa nos tamanhos das fibras foram observadas entre os dois grupos de cavalos no estágio de pré-treinamento. O tamanho das fibras não alterou significativamente no grupo controle, mas pôde ser observada uma tendência para um aumento no tamanho da fibra com a idade. De toda esta avaliação, a média da área de corte transversal das fibras dos tipos I e IIX não alteraram de maneira significativa com o treinamento e a interrupção do treinamento.

Os perfis morfométricos da região profunda do músculo glúteo diferem acentuadamente da região superficial de forma que, o maior diâmetro das fibras do tipo I, ou seja, a maior área de corte transversal ocupada por estas fibras, o alto valor de capilaridade por fibra e a alta capacidade oxidativa mostradas pela reação histoquímica NADH-tr confirmam a hipótese de que este músculo possui uma função postural (SERRANO et al., 1996).

Existe uma grande variabilidade dos tipos de fibras na composição do músculo glúteo médio de cavalo de acordo com a profundidade da amostragem. Entretanto, nenhuma diferença nos tamanhos do tipo de fibra (diâmetro menor e área de corte transversal) foram detectadas sob diferentes locais de amostragem (SERRANO et al., 1996).

Rivero et al. (1992, 1996) relataram que, no músculo glúteo médio de cavalos da raça Lusitano, os tipos de fibras I e IIA são maiores nas regiões profundas do que nas regiões superficiais. Enquanto, os tipos de fibras IIX foram maiores nas regiões mais superficiais. Além disso, acredita-se que o tamanho das fibras do tipo I seja mais homogêneo na região profunda do que

na região superficial do músculo. Ao contrário, as fibras do tipo IIX variam mais em tamanho na região mais superficial do que na região profunda.

Rivero (1996), afirma ser possível ocorrer uma relação entre o tamanho dos diferentes tipos de fibras musculares com os padrões que regem a ativação destas fibras musculares durante a atividade física. Explica esta possibilidade afirmando que, na atividade física as fibras musculares são recrutadas de acordo com o trabalho muscular. E que, as respostas musculares ao treinamento dependem das características do estímulo, tais como tipo de exercício, intensidade e duração e ainda, do estado em que se encontra o músculo antes do início do treinamento.

O treinamento de enduro determina um impacto marcante nas características do músculo esquelético de cavalos tanto nas fibras musculares, como no músculo glúteo médio como um todo; a magnitude de algumas dessas alterações com o treinamento, como a mudança de fibra rápida para lenta no fenótipo de MyHC, dependem da duração do treinamento (no total). Nem as modificações do treinamento, nem aquelas da interrupção do treinamento são homogêneas no músculo glúteo médio, a não ser que elas sejam particularmente notificadas na avaliação feita na região mais profunda do músculo (SERRANO et al., 2000).

A resposta adaptativa do músculo esquelético frente ao exercício é espécie específica (PETTE & VRBOVÁ, 1992; PETTE & STARON, 1997; PETTE, 1998). Pois, as diferenças fisiológicas entre espécies são relacionadas ao tamanho corporal da espécie (ROME et al., 1990).

Nos exercícios em que se buscam resistência afigura-se uma transição de fibras de contração rápida para contração lenta. O músculo esquelético em suas condições de adaptação em resposta ao estresse metabólico, modifica a expressão das isoformas de MyHC (SERRANO & RIVERO, 2000; BALDWIN & HADDAD, 2001).

É provável que, a porcentagem das fibras de contração lenta do grupo de equinos não treinados deste estudo, sofram mudanças no sentido de rápida para lenta ao longo do período de treinamento para enduro, ou seja, quanto maior o período de treinamento, maior serão as mudanças nos

fenótipos das fibras musculares. Tendo em vista que, o grupo de equinos treinados apresentaram maiores proporções das fibras do tipo I.

Em equinos PSA submetidos a treinamento de resistência observou-se que, o programa de treinamento utilizado promoveu o aumento do potencial aeróbio no músculo glúteo médio, em detrimento do potencial glicolítico (MARTINS et al.; 2007).

Pode-se aferir a efetividade do treinamento físico por meio da análise de biópsias musculares extraídas antes e depois da realização do programa de treinamento (RIVERO, 1996). Estudos elucidam a resposta muscular frente ao exercício e ainda, sobre como o treinamento físico estabelece mudanças nestas respostas (SNOW & VALBERG 1994; RIVERO & PIERCY, 2004).

As implicações fisiológicas das adaptações com treinamento de resistência são uma redução clara na velocidade máxima de encurtamento, com um aumento concomitante na resistência à fadiga. A principal explicação para a redução na velocidade de contração é que, o estímulo do exercício a longo prazo, induz à síntese de isoformas de MyHC lentas. O aumento na resistência à fadiga depende de um maior número de mitocôndrias e capilares, de melhores atividades das enzimas musculares oxidativas, de menor mobilização do glicogênio endógeno e do uso preferencial da peroxidação lipídica como substrato energético (SERRANO, et al., 2000).

## VIII. CONCLUSÕES

Esses resultados indicam que o treinamento de enduro promove uma transição na composição das fibras musculares do compartimento profundo do músculo glúteo médio de equinos PSA, na direção de IIX→IIA→I.

Os resultados de tipificação muscular obtidos pelas técnicas histoquímica e imunoistoquímica de dupla marcação, através do uso de anticorpos monoclonais anti-MyHC rápida e lenta disponíveis comercialmente, foram similares. No entanto, a histoquímica revelou ser a técnica que demandou menor custo financeiro.

A realização de uma única biópsia muscular para tipificação das fibras musculares, realizada no período pré treinamento, não mostrou ser uma boa ferramenta preditiva do desempenho atlético futuro dos equinos. O estudo revelou que, as biópsias deverão ser realizadas em períodos de treinamento pré-determinados, o que permite reunir informações que possibilitem a avaliação segura da indicação da aptidão atlética do indivíduo.

## IX.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGAARD, P.; ANDERSEN, J.L. Correlation between contractile strength and myosin heavy chain isoform composition in human skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.30, p.1217-1222, 1998.
- ANDERSEN, J. L.; MOHR, F.; BIERING-SØRENSEN, H.; GALBO, M. KJÆR. Myosin heavy chain isoform transformation in single fibres from m. vastus lateralis in spinal cord injured individuals: effects of long-term functional electrical stimulation (FES). *Pflügers Arch.*, v. 431, p. 513–518, 1996.
- ADAMS, G.R.; MCCUE, S.A.; ZENG, M.; BALDWIN, K.M. Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. *Am. J. Physiol.*, v.276, p.R954–R961, 1999.
- ADAMS, G.R.; HADDAD, F.; BALDWIN, K.M. Interaction of chronic creatine depletion and muscle unloading: effects on postural and locomotor muscles. *J. Appl. Physiol.*, v.77, p.1198–1205, 1994.
- ADAMS, G.R.; HATHER, B.M.; BALDWIN, K.M.; DUDLEY, G.A. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J. Appl. Physiol.*, v.74, p.911–915, 1993.
- ALLEN, D.L.; LEINWAND, L.A. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIB or IID myosin heavy chains. *Dev. Biol.*, v. 229, p.383-395, 2001.
- ANDERSEN, J.L.; AAGARD, P. Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve.*, v. 23, p. 1095-1104, 2000.
- ANDERSEN, J.L.; SCHIAFFINO, S. Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.*, v.272, p.C1881–1889, 1997.
- ANDERSEN, J.L.; GRUSCHY-KNUDSEN, T.; SANDRI, C.; LARSSON, L.; SCHIAFFINO, S. Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.86, p.455-460, 1999a.
- ANDERSEN, J.L.; TERZIS, G.; KRYGER, A. Increase in the degree of coexpression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle fibers of the very old. *Muscle Nerve*, v.22, p.449-454, 1999b.
- ANDERSEN, J.L.; KLITGAARD, H.; SALTIN, B. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. *vastus lateralis* of sprinters: influence of training. *Acta Physiol. Scand.*, v.151, p.135-142, 1994.
- ARMSTRONG, R.B.; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, v.171, p.259-272, 1984.
- BALDWIN, M.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.90, p.345-357, 2001.
- BAR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, v.235, p.153-155, 1988.
- BARANY, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, v.50, p.197-216, 1967.
- BARREY, E.; VALETTE, J.P.; JOUGLIN, M.; BLOUIN, C.; LANGLOIS, B. Heritability of percentage of fast myosin heavy chains in skeletal muscles and relationship with performance. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.30, p.289-292, 1999.

- BARREY, E.; VALETTE, J.P.; JOUGLIN, M. Analyse de la composition en chaines lourdes de la myosine chez le cheval: application a la selection du cheval de course. *INRA Prod. Anim.*, v.11, p.160-163, 1998.
- BATES, P.C.; MILLWARD, D.J. Myofibrillar protein turnover. *Biochem J.*, v.214, p.587–592, 1983.
- BEECHER, G.R.; CASSENS, R.G.; HOEKSTRA, W.G.; BRISKEY, E.J. Red and white fiber content and associated post mortem properties of seven porcine muscles. *J. Food Sci.*, v.30, p.969-976, 1965.
- BERGERO, D.; ASSENZA, A.; CAOLA, G. Contribution to our knowledge of the physiology and metabolism of endurance horses. *Livestock Prod. Sci.*, v.92 p.167-176, 2005.
- BIGARD, X.A.; JANMOT, C.; MERINO, D.; LIENHARD, F.; GUEZENNEC, Y.C.; D'ALBIS, A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.81, p.2658-2665, 1996.
- BLANCO, A.R.; PÉREZ, A.J. Tejido muscular. In: GASQUEZ, A.O.; BLANCO, A.R. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de Histología Veterinaria*. Barcelona: Masson, 2004. p.145-152.
- BOOTH F.W.; BALDWIN, K.M. Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In: ROWELL, L.B.; SHEPHERD, J.T. (Eds.). *Handbook of physiology*. Bethesda: American Physiological Society, 1996. p.1075–1123.
- BOOTH, F.W.; KELSO, J.R. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.342, p.231–238, 1973.
- BOOTH, F.W.; WEEDEN, S.H.; TSENG, B.S. Effect of aging on human skeletal muscle and motor function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.26, p.556–560, 1994.
- BOTTINELLI, R.; REGGIANI, C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v.73, p.195-262, 2000.
- BOTTINELLI, R.; CANEPARI, M.; PELLEGRINO, M.A.; REGGIANI, C. Force–velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J. Physiol.*, v.495, p.573–586, 1996.
- BOTTINELLI, R.; CANEPARI, M.; REGGIANI, C.; STIENEN, G.J.M. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol.*, v.481, p.663–675, 1994.
- BULLER, A.J.; ECCLES, J.C.; ECCLES, R.M. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J. Physiol.*, v.150, p.417-439, 1960.
- BUTLER-BROWNE, G.S.; WHALEN, R.G. Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.*, v.102, p.324–334, 1984.
- BUTLER-BROWNE, G.S.; PRULIERE, G.; CAMBON, N.; WHALEN, R.G. Influence of the dwarf mouse mutation on skeletal and cardiac myosin isoforms. Effect of one injection of thyroxine on skeletal and cardiac muscle phenotype. *J. Biol. Chem.*, v.262, p.15188–15193, 1987.
- BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.*, v.23, p.369-397, 1970.
- BROWN, N.A.; KAWCAK, C.E.; MCILWRAITH, C.W.; PANDY, M.G. Architectural properties of distal forelimb muscles in horses, *Equus caballus*. *J. Morphol.*, v.258, p.106–114, 2003.

- BRUCE, V.L.; SCHURG, W.A. Muscle fiber architecture and nerve innervation in the gluteus medius of the horse. *Anat. Histol. Embryol.*, v.19, p.77-95, 1990.
- BULLER, A.J.; ECCLES, J.C.; ECCLES, R.M. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J. Physiol.*, v.205, p.581-597, 1960.
- CAIOZZO, V.J.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Response of slow and fast muscle to hypothyroidism - maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am. J. Physiol.*, v.263, p.C86-C94, 1992.
- CAIOZZO, V.J.; BAKER, M.J.; HERRICK, R.E.; TAO, M.; BALDWIN, K.M. Effect of spaceflight on skeletal muscle-mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.76, p.1764-1773, 1994.
- CAIOZZO, V.J.; HADDAD, F.; BAKER, M.J.; HERRICK, R.E.; PRIETTO, N.; BALDWIN, K.M. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.81, p.123-132, 1996.
- CAIOZZO, V.J.; BAKER, M.J.; BALDWIN, K.M. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.*, v.85, p.2237-2248, 1998.
- CANEPARI, M.; CAPPELLI, V.; PELLEGRINO, M.A.; ZANARDI, M.C.; REGGIANI, C. Thyroid hormone regulation of MHC isoform composition and myofibrillar ATPase activity in rat skeletal muscles. *Arch. Physiol. Biochem.*, v.106, p.308-315, 1998.
- CAPITANIO, M.; CANEPARI, M.; CACCIAFFESTA, P.; LOMBARDI, V.; CICCHI, R.; MAFFEI, M.; PAVONE, F.S.; BOTTINELLI, R. Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.103, p.87-92, 2006.
- CARRARO, U.; MORALE, D.; MUSSINI, I.; LUCKE, S.; CANTINI, M.; BETTO, R.; CATANI, C.; DALLA LIBERA, L.; BETTO, D.D.; NOVENTA, D. Chronic denervation of rat hemidiaphragm: maintenance of fiber heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms. *J. Cell Biol.*, v.100, p.161-174, 1985.
- CARROLL, S.; NICOTERA, P.; PETTE, D. Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.277, p.C1122-C1129, 1999.
- CASTEJON, F.; RUBIO, D.; TOVAR, P.; VINUESA, M.; RIBER, C. A comparative study of aerobic capacity and fitness in three different horse breeds (Andalusian, Arabian e Anglo-Arabian). *Zentralbl. Veterinärmed.*, v.41, p.645-652, 1994.
- CATZ, D.S.; FISCHER, L.M.; KELLEY, D.B. Androgen regulation of a laryngeal-specific myosin heavy chain mRNA isoform whose expression is sexually differentiated. *Dev. Biol.*, v.171, p.448-457, 1995.
- CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Differences in molecular structure among the porcine myosin heavy chain 2a, 2x, and 2b isoforms. *Meat Sci.*, v.57, p.311-317, 2001.
- CHIKUNI, K.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Absence of the functional myosin heavy chain 2b isoform in equine skeletal muscles. *Zool. Sci.*, v.21, p.589-596, 2004.
- CHIN, E.R.; OLSON, E.N.; RICHARDSON, J.A.; YANG, Q.; HUMPHRIES, C.; SHELTON, J.M.H.; WU, W.Z.; BASSEL-DUBY, R.; WILLIAMS, R.S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway control skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.*, v.12, p.2499-2509, 1998.

- CLOSE, R. Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *J Physiol (Lond)*, v. 193, p. 45-55, 1967.
- CONJARD, A.; PEUKER, H.; PETTE, D. Energy state and myosin heavy chain isoforms in single fibres of normal and transforming rabbit muscles. *Pflugers Arch.*, v.436, p.962-969, 1998.
- D'ALBIS, A.; BUTLER-BROWNE, G. The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals: a review. *BAM*, v.3, p.7-16, 1993.
- D'ALBIS, A.; LENFANT-GUYOT, M.; JANMOT, C.; CHANOINE, C.; WEINMAN, J.; GALLIEN, C.L. Regulation by thyroid hormones of terminal differentiation in the skeletal dorsal muscle. I Neonate mouse. *Dev. Biol.*, v.123, p.25-32, 1987.
- D'ALBIS, A.; GOUBEL, F.; COUTEAUX, R.; JANMOT, C.; MIRA, J.C. The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal differentiation – Denervation induces differentiation into slow-type muscles. *Eur. J. Biochem.*, v.223, p.249-258, 1994.
- D'ALBIS, A.; CHANOINE, C.; JANMOT, C.; MIRA, J.C.; COUTEAUX, R.; Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoforma transitions during rat postnatal development. *Eur J Biochem*. V. 193, p. 155-161, 1990.
- D'ANGELIS, F.H.F.; FERRAZ, G.C.; BOLELI, I.C.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Aerobic training, but not creatine supplementation, alters the gluteus medius muscle. *J. Anim. Sci.*, v.85, p.579-585, 2005.
- DANIELI-BETTO, D.; BETTO, R.; MEGIGHIAN, A.; MIDRIO, M.; SALVIATI, G.; LARSSON, L. Effects of age on sarcoplasmic reticulum properties and histochemical composition of fast-and slow-twitch rat muscles. *Acta Physiol. Scand.*, v.154, p.59-64, 1995.
- DESPLANCHES, D.; MAYET, M.H.; ILYINA-KAKUEVA, E.I.; SEMPORE, B.; FLANDROIS, R. Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. *J. Appl. Physiol.*, v.68, p.48-52, 1990.
- DA COSTA, N.; BLACKLEY, R.; ALZUHERRI, H.; CHANG, K.C. Quantifying the temporospatial expression of postnatal and skeletal myosin heavy chain genes. *J. Histochem. Cytochem.*, v.50, p.353-364, 2002.
- DEMIREL, H.A.; POWERS, S.K.; NAITO, H.; HUGHES, M.; COOMBES, J.S. Exercise induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose response relationship. *J. Appl. Physiol.*, v.86, p.1002-1008, 1999.
- DINGBOOM, E.G.; VAN OUDHEUSDEN, H.; EIZEMA, K.; WEIJS, W.A. Changes in fibre type composition of gluteus medius and semitendinosus muscles of Dutch Warmblood foals and the effect of exercise during the first year postpartum. *Equine Vet. J.*, v.34, p.177-183, 2002.
- DUBOWITZ, V. *Muscle biopsy: a practical approach*. London: Bailliere Tindall, 1985.
- DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. *Muscle Biopsy: a modern approach*. London: W.B. Saunders, 1973.
- DUREN, S.E. Feeding the endurance horse. In: PAGAN, J.D. (Ed.). *Advances in equine nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 2000. p.351-363.
- EDDINGER, T.J. Review. Myosin heavy chain isoforms and dynamic contractile properties: skeletal versus smooth muscle. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, v. 119, p. 425-434, 1998.
- EIZEMA, K.; VAN DEN BURG, M.; KIRI, A.; DINGBOOM, E.G.; VAN OUDHEUSDEN, H.; GOLDSPINK, G.; WEIJS, W.A. Differential expression of equine myosin heavy-

chain mRNA and protein isoforms in a limb muscle. *J. Histochem. Cytochem.*, v.51, p.1207–1216, 2003.

EIZEMA, K.; VAN DEN BURG, M.M.; DE JONGE, H.W.; DINGBOOM, E.G.; WEIJS, W.A.; EVERTS, M.E. Myosin heavy chain isoforms in equine gluteus medius muscle: comparison of mRNA and protein expression profiles. *J. Histochem. Cytochem.*, v.53, p.1383–1390, 2005.

ENGLISH, A.W.; EASON, J.; SCHWARTZ, G.; SHIRLEY, A.; CARRASCO, D.I. Sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle: myosin heavy chain composition of neuromuscular compartments. *Cells Tissues Organs.*, v.164, p.179–191, 1999.

ENNION, S.; SANT'ANA, PEREIRA, J.; SARGEANT, A.J.; YOUNG, A.; GOLDSPINK, G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.16, p.35–43, 1995.

ENOKA, R.M. Morphological features and activation patterns of motor units. *J. Clin. Neurophysiol.*, v.12, p. 538–559, 1995.

ENOKA, R.M.; FUGLEVAND, A.J. Motor unit physiology: some unresolved. *Muscle Nerve*, v.24, p.4–17, 2001.

ERIKSON, H.H. Fisiologia do exercício. In: DUKES, M.J.S. In:\_\_\_\_. *Fisiologia dos animais domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 277–296.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Skeletal muscle adaptation with use and disuse. Comparative aspects between species. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 42., 1996, Lillehammer. *Proceedings...* Lillehammer, 1996. p.1–16.

ESSEN-GUSTAVSSON, B. Training effects on skeletal muscle. In: KALLINGS, P.(Ed.). INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE SPORTS MEDICINE, 1990, Uppsala. *Proceedings...* Uppsala: The Almqvist and Wiksell-Tryckeri, 1990. p.18–23.

ESSÉN-Gustavsson, B.; KARLSTRÖM, K.; LINDHOLM, A. Fibre types, enzymes activities and substrate utilization in skeletal muscle of horses competing in endurance rides. *Equine Vet J.*, v. 16, p. 197–202, 1984.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Muscle fiber characteristics of active and inactive Standardbred horses. *Equine Vet. J.*, v.17, p.434–438, 1985.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; McMIKEN, D.; KARLSTRÖM, K.; LINDHOLM, A.; PERSSON, S.; THORNTON, J. Muscular adaptations to intensive training and detraining. *Equine Vet. J.*, v.21, p.27–33, 1989.

ESSEN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A.; McMIKEN, D. Skeletal muscle characteristics in young Standardbreds in relation to growth and early training. In: SNOW D.H.; PERSSON, S.G.B.; ROSE, R.J. *Equine exercise physiology*. Cambridge: Burligton Press, 1983. p.200–210.

ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A.; THOMTON, J. Histochemical properties of muscle fibre types and enzyme activities in skeletal muscles of standardbred trotters of different ages. *Equine Vet J.* v. 12, p. 175–180, 1980.

ETO, D.; YAMANO, S.; KASASHIMA, Y.; SUGIURA, T.; NASU, T.; TOKURIKI, M.; MIYATA, H. Effect of controlled exercise on middle gluteal muscle fibre composition in thoroughbred foals. *Equine Vet. J.*, v.35, p.676–680, 2003.

FAUTECK, S.P.; KANDARIAN, S.C. Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. *Am. J. Physiol.*, v.268, p.C419–C424, 1995.

- FITTS, R.H.; WIDRICK, J.J. Muscle mechanics: adaptations with exercise training. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, v.24, p.427-473, 1996.
- FITTS, R.H.; WINDER, W.W.; BROOKE, M.H.; KAISER, K.K.; HOLLOSZY, J.O. Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, v.238, p.C15-C20, 1980.
- FITZSIMONS, D.P.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Isomyosin distribution in rodent muscles: effects of altered thyroid state. *J. Appl. Physiol.*, v.69, p.321-327, 1990.
- FLYCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity - from gene to form and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v.146, p.159-216, 2003.
- GALLER, S.; HILBER, K.; GOHLSCH, B.; PETTE, D. Two functionally distinct myosin heavy chain isoforms in slow skeletal muscle fibres. *FEBS Lett.*, v.410, p.150-152, 1997.
- GAMBKE, B.; LYONS, G.E.; HASELGROVE, J.; KELLY, A.M.; RUBINSTEIN, N.A. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.*, v.156, p.335-339, 1983.
- GOLDBERG, A.L. Work-induced growth of skeletal muscle in normal and hypophysectomized rats. *Am. J. Physiol.*, v.213, p.1193-1198, 1967.
- GOLDSPINK, G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology*, v.20, p.232-238, 2005.
- GOLDSPINK, G. Gene expression in muscle in response to exercise. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.24, p.121-126, 2003.
- 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, 1999a.
- GOLDSPINK, G. Molecular mechanisms involved in the determination of muscle fiber mass and phenotype. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, v.5, p.27-39, 1999b.
- GOLDSPINK, G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v.120, p.5-15, 1998.
- GOLDSPINK, G.; SCUTT, A.; LOGHNA, P.T.; WELLS, D.J.; JAENICKE, T.; GERLACH, G.F. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J. Physiol.*, v.262, p.R356-R363, 1992.
- GOLDSPINK, G.; SCUTT, A.; MARTINDALE, J.; JAENICKE, T.; TURAY, L.; GERLACH, G.F. Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, v.19, p.368-373, 1991.
- GOLL, D.E. Músculo esquelético. In: SWENSON, M.J.; RIECE, W.O. *DUKES - fisiologia dos animais domésticos*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 856.
- GONZALES, E.; SARTORI, J.R. Crescimento e metabolismo muscular. In: \_\_\_\_\_. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p.279-297.
- GORZA, L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, v.38, p.257-265, 1990.

- GREEN, H.J.; D.ÜSTERHÖFT, S.; DUX, L.; PETTE, D. Metabolite patterns related to exhaustion, recovery, and transformation of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.420, p.359–366, 1992.
- GREGORY, P.; LOW, R.B.; STIREWALT, W.S. Changes in skeletal-muscle myosin isoenzymes with hypertrophy and exercise. *Biochem. J.*, v.238, p.55–63, 1986.
- GREGORY, P.; GAGNON, J.; ESSIG, D.A.; REID, S.K.; PRIOR, G.; ZAK, R. Differential regulation of actin and myosin isoenzyme synthesis in functionally overloaded skeletal muscle. *Biochem. J.*, v.265, p.525–532, 1990.
- GUNNING, P.; HARDEMAN, E. Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J.*, v.5, p.3064–3070, 1991.
- GUTMANN, E.; HANZLÍKOVÁ, V. Effect of androgens on histochemical fibre type. Differentiation in the temporal muscle of the guinea pig. *Histochemie*, v.24, p.287–291, 1970.
- GUTMANN, E.; MELICHNA, J.; SYROVÝ, I. Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp. Neurol.*, v.36, p.488–497, 1972.
- GUTH, L.; SAMAHA, F.J. Qualitative differences between Actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.*, v.25, p.138–152, 1969.
- GUYTON, A.C. *Fisiologia humana*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HARDINGHAM, G.E.; BADING, H. Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc Res Tech.* v. 46, p. 348–355, 1999.
- HARRIDGE, S.D.R.; BOTINELLI, R.; CANEPARI, M.; PELLEGRINO, M.; REGGIANI, M.; ESBJÖRNSSON, M.; BALSON, P.B.; SALTIN, B. Sprint training, in vitro and in vivo muscle function, and myosin heavy chain expression. *J Appl Physiol.*, v. 84, p. 442–449, 1998.
- HARRIDGE, S.D.R. The muscle contractile system and its adaptation to training. In: MARCONNET, P.; SALTIN, B.; KOMI, P.; POORTMANS, J. (Eds.). *Human muscular function during dynamic exercise*. Basel: Karger, 1996. p.82–94.
- HÄMÄLÄINEN, N.; PETTE, D. Patterns of myosin isoforms in mammalian skeletal fibres. *Microsc. Res. Tech.*, v.30, p.381–389, 1995.
- HANZLÍKOVÁ, V.; SCHIAFFINO, S.; SETTEMBRINI, P. Histochemical fiber types characteristics in the normal and the persistent levator ani muscle of the rat. *Histochemie*, v.22, p.45–50, 1970.
- HATHER, B.M.; TESCH, P.A.; BUCHANAN, P.; DUDLEY, G.A. Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol. Scand.*, v.143, p.178, 1991.
- HAYS, A.P.; ARMBRUSTMACHER, V.W. Skeletal muscle. In: RUBIN, E.; FABER, J.L. *Pathology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.1414–1440.
- HENCKEL, P. Training an growth induced changes in the middle gluteal muscle of young Standerbred trotters. *Equine Vet. J.*, v.15, p.134–140, 1983.
- HODGSON, D.R.; ROSE, R.J.; DIMAURO, J. Effects of a training on muscle composition in horse. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.12–15, 1986.
- HOOK, P.; Li, X.P.; SLEEP, J.; HUGHES, S.; LARSSON, L. In vitro motility speed of slow myosin extracted from single soleus fibres from young and old rats. *J. Physiol.*, v.520, p.463–471, 1999.

- HOOPER, S.L.; THUMA, J.B. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.*, v.85, p.1001-1060, 2005.
- HORTOBAGYI, T.; HOUMARD, J.A.; STEVENSON, J.R.; FRASER, D.D.; JOHNS, R. A.; ISRAEL, R.R. The effects of detraining on power athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.25, p.929-935, 1993.
- HORTON, M.J.; BRANDON, C.A.; MORRIS, T.J.; BRAUN, T.W.; YAW, K.M.; SCIOTE, J.J. Abundant expression of myosin heavy-chain IIB RNA in a subset of human masseter muscle fibres. *Arch. Oral Biol.*, v.46, p.1039-1050, 2001.
- HOWALD, H.; HOPPELER, H.; CLAASSEN, H.; MATHIEU, O.; STAUB, R. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch.*, v.403, p.369-376, 1985.
- HUEY, K.A.; BODINE, S.C. Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur. J. Biochem.*, v.256, p.45-50, 1998.
- IANUZZO, D.; PATEL, P.; CHEN, V.; O'BRIEN, P.; WILLIAMS, C. Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature*, v.270, p.74-76, 1977.
- IANUZZO, C.D.; GOLLNICK, P.D.; ARMSTRONG, R.B. Compensatory adaptations of skeletal muscle fiber types to a long-term functional overload. *Life Sci.*, v.19, p.1517-1524, 1976.
- ISLAS, A.; QUEZADA, M.; MORA, G.; LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MERINO, V.; ROJAS, H.; CARRILLO, C.; ROJAS, M.E.; ZEGPIG, A. Caracterización de las fibras del músculo gluteus medius en equinos por métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos. *Arch. Med. Vet.*, v.33, p.55-62, 2001.
- IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissuespecific manner. *Science*, v.231, p.597-600, 1986.
- JAKUBIEC-PUKA, A.; CIECHOMSKA, I.; MORGA, J.; MATUSIAK, A. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v.122, p.355-362, 1999.
- JAKUBIEC-PUKA, A.; KORDOWSKA, J.; CATANI, C.; CARRARO, U. Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. *Eur. J. Biochem.*, v.193, p.623-628, 1990.
- JARVIS, J.C.; MOKRUSCH, T.; KWENDE, M.M.N.; SUTHERLAND, H.; SALMONS, S. Fast-to-slow transformation in stimulated rat muscle. *Muscle Nerve*, v.19, p.1469-1475, 1996.
- JASCHINSKI, F.; SCHULER, M.; PEUKER, H.; PETTE, D. Transitions in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *Am. J. Physiol.*, v.274, p.C365-C371, 1998b.
- JOUBERT, Y.; TOBIN, C.; LEBART, M.C. Testosterone-induced masculinization of the rat levator ani muscle during puberty. *Dev. Biol.*, v.162, p.104-110, 1994.
- JANSEN, K.M.; PAVLATH, G.K. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J. Cell Biol.*, v.174, p.403-413, 2006.
- JASCHINSKI, F.; SCHULER, M.; PEUKER, H.; PETTE, D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *Am. J. Physiol.*, v.274, p.C365-370, 1998.
- KADI F.; ERIKSSON A.; HOLMNER S.; BUTLER-BROWNE, G.S.; THORNELL, L.E. Cellular adaptation of trapezius muscle in strengthtrained athletes. *Histochem. Cell Biol.*, v.111, p.189-195, 1999.

- KARLSSON, A.H.; KLONT, R.E.; FERNANDEZ, X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Prod. Sci.*, v.60, p.255-269, 1999.
- KARLSTRÖM, K.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Myosin heavy chain-based fibre types in red cell hyper- and normovolaemic Standardbred trotters. *Equine Vet J Supplement*. v.34, p. 279-282, 2002.
- KELLY, A.M.; RUBISTEIN, N.A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology*. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1994. p.119-33.
- KLITGAARD, H.; ZHOU, M.; RICHTER, E.A. Myosin heavy chain composition of single fibres from m. biceps brachii of male body builders. *Acta Physiol. Scand.*, v.140, p.175-180, 1990.
- KUBIS, H.P.; HALLER, E.A.; WETZEL, P.; GROS, G. Adult fast myosin pattern and  $Ca^{2+}$  - induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture. *Proc Natl Acad Sci. USA*. V. 94, p. 4205-4210, 1997.
- LARSSON, L.; ANSVED, T. Effects of ageing on the motor unit. *Prog. Neurobiol.*, v.45, p.397-458, 1995.
- LARSSON, L.; MOSS, R.L. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J. Physiol.*, v.472, p. 595-614, 1993.
- LARSSON, L.; MULLER, U.; LI, X.; SCHIAFFINO, S. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol. Scand.*, v.153, p.109-116, 1995.
- LARSSON, L.; LI, X.P.; TERESI, A.; SALVIATI, G. Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *J. Physiol.*, v.481, pt.1, p.149-161, 1994.
- LARSSON, L.; ANSVED, T.; EDSTROM, L.; GORZA, L.; SCHIAFFINO, S. Effects of age on physiological, immunohistochemical and biochemical properties of fast-twitch single motor units in the rat. *J. Physiol.*, v.443, p.257-275, 1991.
- LAÜGER, P. Electrogenic ion pump. Sunderland, M.A. *Sinauer associates, Inc.* 1991.
- LEEUEW, T.; PETTE, D. Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy chain isoforms during fast-to-slow transition of low- frequency stimulated rabbit muscle. *Eur. J. Biochem.*, v.213, p.1039-1046, 1993.
- LEEUEW, T.; PETTE, D. Coordinate changes of myosin light and heavy chain isoforms during forced fiber type transitions in rabbit muscle. *Dev. Genet.*, v.19, p.163-168, 1996.
- LEFAUCHEUR, L.; ECOLAN, P.; PLANTARD, L.; GUEGUEN, N. New insights into muscle fiber types in the pig. *J. Histochem. Cytochem.*, v.50, p.719-730, 2002.
- LEFAUCHER, L. Myofiber typing and pig meat production. *Slov. Vet. Res.*, v.38, p.5-33, 2001.
- LEFAUCHER, L.; HOFFMAN, R.K.; GERRARD, D.E.; OKAMURA, C.S.; RUBSTEIN, N.; KELLY, A. Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in pigs. *J. Anim. Sci.* v. 76, p. 1584-1593, 1998
- LEWIS, S.E.M.; KELLY, F.J.; GOLDSPINK, D.F. Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.*, v.217, p.517-526, 1984.

- LI, W.P.; HUGHES, S.M.; SALVIATI, G.; TERESI, A.; LARSSON, L. Thyroid hormone effects on contractility and myosin composition of soleus muscle and single fibres from young and old rats. *J. Physiol.*, v.494, p.555–567, 1996.
- LÖMO, T.; WESTGAARD, R.H.; DAHL, H.A. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B*, v.187, p.99–103, 1974.
- LOPEZ-RIVERO, J.L.; SERRANO, A.L.; DIZ, A.M.; GALISTEO, A.M. Variability of muscle fibre composition and fibre size in the horse gluteus medius: an enzyme-histochemical and morphometric study. *J. Anat.*, v.181, p.1–10, 1992.
- LOPEZ-RIVERO, J.L.; MORALES-LOPEZ, J.L.; GALISTEO, A.M.; AGUERA, E. Muscle fibre type composition in untrained and endurance-trained Andalusian and Arab horses. *Equine Vet. J.*, v.23, p.91–93, 1991.
- LOUGHNA, P.T.; MORGAN, M.J. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.439, p.52–55, 1999.
- LOUGHNA, P.T.; IZUMO, S.; GOLDSPINK, G.; NADAL-GINARD, B. Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adults contractile protein genes in skeletal muscle. *Development*, v.109, p.217–223, 1990.
- LOVELL, D.K.; ROSE, R.J. Changes in skeletal muscle composition on response to interval high intensity training. In: PERSSON, S.G.B.; LINDHOLM, A.; JEFFCOTT, L. B. *Equine exercise physiology 3*. Davis: ICEEP Publications, 1991. p.215–222.
- LYONS, G.E.; KELLY, A.M.; RUBINSTEIN, N.A. Testosterone-induced changes in contractile protein isoforms in the sexually dimorphic temporalis muscle of the guinea pig. *J. Biol. Chem.*, v.261, p.13278–13284, 1986.
- LEFAUCHER, L.; ECOLAN, P.; BARZIC, Y.M.; MARION, J.; LE DIVIDICH, J. Early postnatal food intake alters myofiber maturation in pig skeletal muscle. *J. Nutr.*, v.133, p.140–147, 2003.
- LEFAUCHEUR, L.; ECOLAN, P.; PLANTARD, L.; GUEGUEN, N. New insights into muscle fiber types in the pig. *J. Histochem. Cytochem.*, v.50, p.719–730, 2002.
- LEFAUCHEUR, L.; HOFFMAN, R.K.; GERRARD, D.E.; OKAMURA, C.S.; RUBINSTEIN, N.; KELLY, A. Evidence for three adult fast myosin heavy chain isoforms in type II skeletal muscle fibers in pigs. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1584–1593, 1998.
- LEFEUVRE, B.; CROSSIN, F.; FONTAINE-PERUS, J.; BANDMAN, E.; GARDAHAUT, M.F. Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. *Mech. Dev.*, v.58, p.115–127, 1996.
- LENNINGER, A.L. *Bioquímica*. 2.ed. Barcelona: Omega, 1981.
- LEWIS, L.D. *Equine clinical nutrition: feeding and care*. São Paulo: Roca, 1995. 248p.
- LINDHOLM, A.; PIEHL, K. Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of standardbred horses. *Acta Vet. Scand.*, v.15, p.287–309, 1974.
- LINDNER, A.; DAG, S.; MARTI-KORFF, S.; QUIROZ-ROTHER, E.; RIVERO, J.L.L.; DROMMER, W. Effects of repeated biopsying on muscle tissue in horses. *Equine Vet. J.*, v.34, p.619–624, 2002.
- LINNANE, L.; SERRANO, A.L.; RIVERO, J.L.L. Distribution of fast myosin heavy chain-based muscle fibres in the gluteus medius of untrained horses: mismatch between antigenic and ATPase determinants. *J. Anat.*, v.194, p.363–372, 1999.

- LUTZ, G.J.; BREMNER, S.; LAVEVARDI, N.B.; LIEBER, R.L.; ROME, L.C. Quantitative analysis of muscle fibre type and myosin heavy chain distribution in the frog hindlimb: implications for locomotory design. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.19, p.717-731, 1998.
- LIANG, C.S.; KOBIYAMA, A.; SHIMIZU, A.; SASAKI, T.; ASAKAWA, S.; SHIMIZU, N.; WATABE, S. Fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of medaka *Oryzias latipes* enrolled in temperature adaptation. *Physiol. Genomics*, v.29, p.201-214, 2007.
- LIEBER, R.L. *Skeletal muscle structure function and plasticity: the physiological basis of rehabilitation*. Philadelphia: Lippincott, 2002. Chap. 4-5, p.173-285.
- LIEBER, R.L. *Skeletal muscle structure and function: implications for rehabilitation and sports medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992.
- LIBERA, L.D.; CARPENE, E. Myosin heavy and light chains and myosin light chain kinase in skeletal and smooth muscle of some wild avian species. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.116, p.45-50, 1997.
- LINDNER, A.; RIVERO, J.L.L.; LIGHTOWLER, C.; ISLAS LETELIER, A. Evaluación de la capacidad competitiva y del efecto del entrenamiento en El caballo de deporte. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE CABALLOS DE DEPORTE-CICADE, 2003, Curitiba. *Abstracts...* Curitiba, 2003. 1 CD-ROM.
- LINDNER, A.; DAG, S.; KISSENBECK, S.; MOSEN, H.; RIVERO, J.L.L.; DROMMER, W. Efecto de entrenamiento, conducido mediante la concentración de lactato sanguíneo, sobre ultraestructura del músculo glúteo medio. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE CABALLOS DE DEPORTE-CICADE, 2001, Buenos Aires, Argentina. *Abstracts...* Buenos Aires, 2001.
- MAHDAVI, V.; IZUMO, S.; NADAL-GINARD, B. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Circ. Res.*, v.60, p.804-814, 1987.
- MORGAN, M.J.; LOUGHNA, P.T. Work overload induced changes in fast and slow skeletal muscle myosin heavy chain gene expression. *FEBS Lett.*, v.255, p.427-430, 1989.
- McCOMAS, A.J. *Skeletal muscle: form and function*. Champaign: Human Kinetics, 1996.
- McKOY, G.; HOU, Y.; YANG, S.Y.; VEGA AVELAIRA, D.; DEGENS, H.; GOLDSPINK, G.; COULTON, G.R. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J. Appl. Physiol.*, v.98, p.2337-2343, 2005.
- McKOY, G.; LEGER, M.E.; BACOU, F.; GOLDSPINK, G. Differential expression of myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in four functionally diverse rabbit skeletal muscles during pre and postnatal development. *Dev. Dyn.*, v.211, p.193-203, 1998.
- MURPHY, A.M. Contractile protein phenotypic variation during development *Cardiovasc. Res.*, v.31, p.E25-33, 1996.
- NAYA, F.Y.; MERCER, B.; SHELTON, J.; RICHARDSON, J.A.; WILLIAMS, R.S.; OLSON, E.N. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin *in vivo*. *J Biol Chem.*, v. 275, p. 4545-4548, 2000.
- NEWLANDS, S.; LEVITT, L.K.; ROBINSON, C.S.; KARPFF, A.B.; HODGSON, V.R.; WADE, R.P.; HARDEMAN, E.C. Transcription occurs in pulses in muscle fibers. *Genes Dev.*, v.12, p.2748-2758, 1998.

- NICKS, D.K.; BENEKE, W.M.; KEY, R.M.; TIMSON, B.F. Muscle fibre size and number following immobilisation atrophy. *J. Anat.*, v.163, p.1-5, 1989.
- NOBLE, E.G.; DABROWSKI, B.L.; IANUZZO, C.D. Myosin transformation in hypertrophied rat muscle. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.396, p.260-262, 1983.
- NWOYE, L.; MOMMAERTS, W.F.H.M. The effects of thyroid status on some properties of rat fast-twitch muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.2, p.307-320, 1981.
- O'NEILL, D.S.; ZHENG, D.; ANDERSON, W.K.; DOHM, G.L.; HOUMARD, J.A. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.276, p.R414-419, 1999.
- OHIRA, Y.; JIANG, B.; ROY, R.R.; OGANOV, V.; ILYINA-KAKUEVA, E.; MARINI, J.F.; EDGERTON, V.R. Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, v.73, p.S51-S57, 1992.
- OISHI, Y. Relationship between myosin heavy chain-IId isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.66, p.451-454, 1993.
- OISHI, Y.; YAMAMOTO, H.; MIYAMOTO, E. Changes in fibre-type composition and myosin heavy-chain IId isoform in rat soleus muscle during recovery period after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v.68, p.102-106, 1994.
- PAUL, A.C. Muscle length affects the architecture and pattern of innervation differently in leg muscles of mouse, guinea pig, and rabbit compared to those of human and monkey muscles. *Anat. Rec.*, v.262, p.301-309, 2001.
- PAUL, A.C.; ROSENTHAL, N. Different modes of hypertrophy in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, v.156, p.751-760, 2002.
- PATTULLO, M.C.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E.; BARRY, J.A. Effects of lengthened immobilization on functional and histochemical properties of rabbit tibialis anterior muscle. *Exp. Physiol.*, v.77, p.433-442, 1992.
- PERIASAMY, M.; GREGORY, P.; MARTIN, B.J.; STIREWALT, W.S. Regulation of myosin heavy-chain gene expression during skeletal-muscle hypertrophy. *Biochem. J.*, v.257, p.691-698, 1989.
- PERRY, S.V. Properties of muscle proteins - a comparative approach. *J. Exp. Biol.*, v.115, p.31-42, 1985.
- PETER, J.B.; BARNAD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, v.11, p.2627-2633, 1972.
- PETTE, D. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Historical perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.90, p.1119-1124, 2001.
- PETTE, D. Training effects on contractile apparatus. *Acta Physiol. Scand.*, v.162, p.367-376, 1998.
- PETTE, D.; STARON, R.S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell Biol.*, v.115, p.359-372, 2001.
- PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.*, v.50, p.500-509, 2000.
- PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Invited review: what does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve*, v.22, p.666-677, 1999.
- PETTE, D.; PEUKER, H.; STARON, R.S. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol. Scand.*, v.166, p.261-277, 1999.

- PETTE, D.; STARON, R.S. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.*, v.170, p.143-223, 1997.
- PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v.120, p.116-202, 1992.
- PETTE, D.; STARON, R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v.116, p.1-76, 1990.
- PETTE, D.; VRBOVÁ, G. Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve*, v.8, p.676-689, 1985.
- PETTE, D.; RAMIREZ, B.U.; MULLER, W.; SIMON, R.; EXNER, G.U.; HILDEBRAND, R. Influence of intermittent long-term stimulation on contractile, histochemical and metabolic properties of fibre populations in fast and slow rabbit muscles. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, v.361, p.1-7, 1975.
- PEUKER, H.; CONJARD, A.; PUTMAN, C.T.; PETTE, D. Transient expression of myosin heavy chain MHCIIa in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.20, p.147-154, 1999.
- PEUKER, H.; CONJARD, A.; PETTE, D. a-Cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHCIIa and MHCIIb in transforming rabbit muscle. *Am. J. Physiol.*, v. 274, p.C595-C602, 1998.
- PEUKER, H.; PETTE, D. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.*, v.170, p.143-223, 1997.
- PICARD, B.; LEFAUCHER, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.42, p.415 -431, 2002.
- PICARD, B.; JURIE, C.; CASSAR MALEK, I.; HOCQUETTE, J.F.; LEFAUCHER, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M.J.; ALAMI-DURANTE, H.; RESCAN, P.Y. Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez le différentes espèces d'intérêt agronomique. *INRA Prod. Anim.*, v.16, n.2, p.117-123, 2003.
- POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. 3.ed. São Paulo: Manole, 2000. p.527.
- PRINCE, A.; GEOR, R.; HARRIS, P.; HOEKSTRA, K.; GARDNER, S.; HUDSON, C.; PAGAN, J. Comparison of the metabolic responses of trained Arabian and Thoroughbred horses during high and low intensity exercise. In: SYMPOSIUM OF THE EQUINE NUTRITION AND PHYSIOLOGY SOCIETY, 17., 2001, Lexington. *Proceedings...* Lexington, 2001. p.267-272.
- PUTMAN, C.T.; CONJARD, A.; PEUKER, H.; PETTE, D. a-cardiac like myosin heavy chain MHCIIa is not upregulated in transforming rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.20, p.155-162, 1999.
- RILEY, D.A.; SLOCUM, G.R.; BAIN, J.L.W.; SEDLAK, F.R.; SOWA, T.E.; MELLENDER, J.W. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.*, v.69, p.58-66, 1990.
- RIVERO, J.L.L. Muscle variables. In: LINDNER, A. *Performance diagnosis of horse*. Wageningen: Wageningen Press, 1997. p.44-71.
- RIVERO, J.L.L.; PIERCY, R.J. Muscle physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; GEOR, J. *Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of the equine athlete*. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2004. p.45-76.
- RIVERO, J.L.L.; CLAYTON, H. The potential role of the muscle in kinematic characteristics. *Pferdeheilkunde*, v.12, p.635-640, 1996.

- RIVERO, J.L.L.; SPORLEDER, H.P.; QUIROZ-ROTHER, E.; VERVUERT, I.; COENEN, M.; HARMEYER, J. Oral L-carnitine combined with training promotes changes in skeletal muscle. *Equine Vet. J. Suppl.*, v.34, p.269-274, 2002.
- RIVERO, J.L.L.; SERRANO, A.L.; BARREY, E.; VALETTE, J.P.; JOUGLIN, M. Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.20, p.2121-2122, 1999.
- RIVERO, J.L.L.; TALMADGE, R.J.; EDGERTON, V.R. Myosin heavy chain isoforms in adult equine skeletal muscle: an immunohistochemical and electrophoretic study. *Anat. Rec.*, v.246, p.185-194, 1996.
- RIVERO, J.L.L.; RUZ, M.C.; SERRANO, A.L.; DIZ, A.M. Effects of a 3 month endurance training programme on skeletal muscle histo-chemistry in Andalusian, Arabian and Anglo-Arabian horses. *Equine Vet. J.*, v.27, p.51-59, 1995a.
- RIVERO, J.L.L.; SERRANO, A.L.; HENCKEL, P. Activities of selected aerobic and anaerobic enzymes in the gluteus medius muscle of endurance horses with different performance records. *Vet. Rec.*, v.137, p.187-192, 1995b.
- RIVERO, J.L.L.; SERRANO, A.L.; DIZ, A.M.; MORALES, J.L. Changes in cross sectional area and capillary supply of the muscle fiber population in equine gluteus medius muscle as a function of sampling depth. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.32-33, 1993.
- RIVERO, J.L.L.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J.G.; VIVO, J.; RODRIGUEZ BARBUDO, M.V. Skeletal muscle fiber size in untrained and endurance-trained horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.847-850, 1992.
- RIVERO, J.L.L.; AGÜERA, E.; MONTEVERDE, J.G.; BARBUDO, M.R.; MIRO, F. Comparative study of muscle fiber type composition in the middle gluteal muscle of Andalusian, Thoroughbred and Arabian horses. *J. Equine Vet. Sci.*, v.9, p.377-340, 1989.
- ROME, L.C.; SOSNICKI, A.A.; GOBLE, D.O. Maximum velocity of shortening of three fibre types from horse soleus muscle: implications for scaling with body size. *J. Physiol.*, v.431, p.173-185, 1990.
- RONÉUS, N.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Plasma lactate response to submaximal and maximal exercise tests with training, and its relationship to performance and muscle characteristics in standardbred trotters. *Equine Vet. J.*, v.26, p.117-112, 1994.
- ROSE, R.J. Endurance exercise in the horse- a review. Part I. *Br. Vet. J.*, v.142, p.532-541, 1986.
- ROY, R.R.; BALDWIN, K.M.; MARTIN, T.P.; CHIMARUSTI, S.P.; EDGERTON, V.R. Biochemical and physiological changes in overloaded rat fast- and slow-twitch ankle extensors. *J. Appl. Physiol.*, v.59, p.639-646, 1985.
- RUBINSTEIN, N.A.; KELLY, A.M. Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat. *Dev. Biol.*, v.62, p.473-485, 1978.
- RUSSEL, S.D.; CAMBON, N.; NADAL-GINARD, B.; WHALEN, R.G. Thyroid hormone induces a nerve-independent precocious expression of fast myosin heavy chain mRNA in rat hindlimb skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.6370-6374, 1988.
- RYAN, J.M.; COBB, M.A.; HERMANSON, J.W. Elbow extensor muscles of the horse: postural and dynamic implications. *Acta Anat. (Basel)*, v.144, p.71-79, 1992.
- SAITOH, A.; OKUMOTO, T.; NAKANO, H.; WADA, M.; KATSUTA, S. Age effect on expression of myosin heavy and light chain isoforms in suspended rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.86, p.1483-1489, 1999.

- SAKIYAMA, K.; ABE, S.; TAMATSU, Y.; IDE, Y. Effects of stretching stress on the muscle contraction proteins of skeletal muscle myoblast. *Biomed. Res.*, v.26, p.61-68, 2005.
- SALMONS, S. Exercise, stimulation and type transformation of skeletal muscle. *Int. J. Sports Med.*, v.15, p.136-141, 1994.
- SALMONS, S.; VRBOVA', G. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol.*, v.201, p.535-549, 1969.
- SALTIN, B.; GOLLNICK, P.D. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. Handbook of physiology, skeletal muscle. Baltimore: Waverly Press, 1983. p.555-631.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, v.76, p.371-423, 1996.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v.77, p.493-501, 1994.
- SCHIAFFINO, S.; GONA, L.; SARTORE, S.; SAGGIN, L.; AUSONI, S.; VIANELLO, M.; GUNDERSEN, K. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.10, p.197-205, 1989.
- SCHIAFFINO, S.; GORZA, L.; PITTON, G.; SAGGIN, L.; AUSONI, S.; SARTORE, S.; LOMO, T. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in enervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev. Biol.*, v.127, p.1-11, 1988.
- SCHIAFFINO, S.; SAGGIN, L.; VIEL, A.; AUSONI, S.; SARTORE, S.; GORZA, L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: G. BENZI, G.; PACKER, L.; SILIPRANDI, N. (Eds.). *Biochemical aspects of physical exercise*. Amsterdam: Elsevier, 1986. p.27-34.
- SCHUBACK, K.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Muscle anaerobic response to a maximal treadmill exercise test in Standardbred trotters. *Equine Vet. J.*, v.30, p.504-510, 1998.
- SELLERS, J.R. Myosins: a diverse superfamily. Review. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1496, p.3-22, 2000.
- SERRANO, A.L.; RIVERO, J.L.L. Myosin heavy chain profile of equine gluteus medius following prolonged draught exercise training and detraining. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.21, p.235-245, 2000.
- SERRANO, A.L.; PEREZ, M.; LUCIA, A.; CHICHARRO, J.L.; QUIROZ-ROTHER, E.; RIVERO, J.L. Immunolabelling, histochemistry and in situ hybridization in human skeletal muscle fibres to detect myosin heavy chain expression at the protein and mRNA level. *J. Anat.*, v.199, p.329-337, 2001.
- SERRANO, A.L.; QUIROZ-ROTHER, E.; RIVERO, J.L.L. Early long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Eur. J. Physiol.*, v.441, p.263-274, 2000.
- SERRANO, A.L.; PETRIE, J.L.; RIVERO, J.L.L.; HERMANSON, J.W. Myosin isoforms and muscle fibre characteristics in equine gluteus medius muscle. *Anat. Rec.*, v.244, p.444-451, 1996.
- S`KORJANC, D.; TRAUB, I.; PETTE, D. Identical responses of fast muscle to sustained activity by low-frequency stimulation in young and aging rats. *J. Appl. Physiol.*, v.85, p.437-441, 1998.

- SMERDU, V.; ERZEN, I. Dynamic nature of fibre-type specific expression of myosin heavy chain transcripts in 14 different human skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, v.22, p.647-655, 2001.
- SMERDU, V.; ČEHOVIN, T.; ŠTRBENC, M.; GREGOR, F. Enzyme and immunohistochemical aspects of skeletal muscle fibers in brown bear (*Ursus arctos*). *J. Morphol.*, v.270, p.154-161, 2009.
- SMERDU, V.; KARSCH-MIZRACHI, I.; CAMPIONE, M.; LEINWAND, L.; SCHIAFFINO, S. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.267, p.C1723-C1728, 1994.
- SNOW, D.H.; VALBERG, S.J. Muscle anatomy, physiology, and adaptations to exercise and training. In: HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. (Eds.). *The athletic horse*. Philadelphia: Saunders, 1994. p.145-179.
- SNOW, D.H.; GUY, P.S. Muscle fibre type composition of a number of limb muscle in different types of horse. *Res. Vet. Sci.*, v.28, p.173-144, 1980.
- SNOW, D.H.; GUY, P.S. Percutaneous needle muscle biopsy in the horse. *Equine Vet. J.*, v.8, p.150-155, 1976.
- SOSA-LEON, L.A. Treatment of exercise-induced dehydration. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.14, p.159-173, 1998.
- SRÉTER, F.A.; LOPEZ, J.R.; ALAMO, L.; MABUCHI, K.; GERGELY, J. Changes in intracellular ionized Ca concentration associated with muscle fiber type transformation. *Am J Physiol.*, v. 253, p. C296-C300, 1987.
- STARON, R.S. Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can. J. Appl. Physiol.*, v.22, p.307-327, 1997.
- STARON, R.S. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in individual human muscle fibres. *Histochemistry*, v.96, p.21-24, 1991.
- STARON, R.S.; JOHNSON, P. Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v.106, p.463-475, 1993.
- STARON, R.S.; PETTE, D. Nonuniform myosin expression along single fibers of chronically stimulated and contralateral rabbit tibialis anterior muscles. *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.*, v.409, p.67-73, 1987.
- STARON, R.S.; PETTE, D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibres. *Histochemistry*, v.86, p.19-23, 1986.
- STARON, R.S.; HAGERMAN, F.C.; HIKIDA, R.S.; MURRAY, T.F.; HOSTLER, D.P.; CRILL, M.T.; RAGG, K.E.; TOMA, K. FIBER type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J. Histochem. Cytochem.*, v.48, p.623-629, 2000.
- STARON, R.S.; KRAEMER, W.J.; HIKIDA, R.S.; FRY, A.C.; MURRIA, J.D.; CAMPOS, G.E. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.*, v.111, p.117-123, 1999.
- STARON, R.S.; KRAEMER, W.J.; HIKIDA, R.S.; REED, D.W.; MURRAY, J.D.; CAMPOS, G.E.R.; GORDON, S.E. Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem. Cell Biol.*, v.110, p.73-80, 1998.
- STARON, R.S.; KARAPONDO, D.L.; KRAEMER, W.J.; FRY, A.C.; GORDON, S.E.; FALKEL, J.E.; HAGERMAN, F.C.; HIKIDA, R.S. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J. Appl. Physiol.*, v.76, p.1247-1255, 1994.

- STEPHENSON, G.M. Hybrid skeletal muscle fibers: a rare or common phenomenon? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.28, p.692-702, 2001.
- STEVENS, L.; GOHLSCH, B.; MOUNIER, Y.; PETTE, D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett.*, v.463, p.15-18, 1999.
- STEVENS, L.; SULTAN, K.R.; PEUKER, H.; GOHLSCH, B.; MOUNIER, Y.; PETTE, D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am. J. Physiol.*, v.277, p.C1044-C1049, 1999a.
- STEVENS, L.; GOHLSCH, B.; MOUNIER, Y.; PETTE, D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett.*, v.463, p.15-18, 1999b.
- STRBENC, M.; SMERDU, V.; ZUPANC, M.; TOZON, N.; FAZARINC, G. Pattern of myosin heavy chain isoforms in different fibre types of canine trunk and limb skeletal muscles. *Cell Tissues Organs.*, v.176, p.178-186, 2004.
- SUCRE, L.E.; HERNÁNDEZ, N.; HECKER TORRES, S. Efecto del entrenamiento sobre las actividades enzimáticas y composición fibrilar en el músculo gluteus medius de Caballos Pura Sangre Venezolanos. *Rev. Cient. (Trujillo)*, v.9, p.489-501, 1999.
- SUGIE, H.; VERITY, A. Postnatal histochemical fiber type differentiation in normal and hypothyroid rat soleus muscle. *Muscle Nerve*, v.8, p.654-660, 1985.
- SUGIURA, T.; MATOBA, H.; MIYATA, H.; KAWAI, Y.; MURAKAMI, N. Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, v.144, p.419-423, 1992.
- SULLIVAN, V.K.; POWERS, S.K.; CRISWELL, D.S.; TUMER, N.; LAROCHELLE, J.S.; LOWENTHAL, D. Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J. Appl. Physiol.*, v.78, p.2115-2120, 1995.
- TALMADGE, R.J. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve*, v.23, p.661-679, 2000.
- TEMPLETON, G.H.; SWEENEY, H.L.; TIMSON, B.F.; PADALINO, M.; DUDENHOEFFER, G.A. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, v.65, p.1191-1195, 1988.
- TERMIN, A.; PETTE, D. Changes in myosin heavy-chain isoforma synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.*, v.204, p.569-573, 1992.
- TERMIN, A.; STARON, R.S.; PETTE, D. Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low- frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles: a single fiber study. *Eur. J. Biochem.*, v.186, p.749-754, 1989.
- THOMASON, D.B.; BOOTH, F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.*, v.68, p.1-12, 1990.
- THOMASON, D.B.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Activity influences on soleus muscle myosin during rodent hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, v.63, p.138-144, 1987.
- TSIKA, R.W.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K.M. Interaction of compensatory overload and hindlimb suspension on myosin isoform expression. *J. Appl. Physiol.*, v.62, p.2180-2186, 1987.
- UHRIN, P.; LIPTAJ, T. Effect of training on fiber composition and phosphate metabolites in rest measured in vitro in muscles of young pigs. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v.102, p.397-401, 1992.

VRBOVA, G. The effect of tenotomy on the speed of contraction of fast and slow mammalian muscles. *J. Physiol.*, v.166, p.241-250, 1963.

VALBERG, S.J.; BORGIA, L. *Muscle adaptations during growth and early training*. St. Paul: University of Minnesota, 2006. Disponível em: <[http://www.ker.com/library/Proceedings/06/1\\_MuscleAdaptions\\_p7.pdf](http://www.ker.com/library/Proceedings/06/1_MuscleAdaptions_p7.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2009.

WILLIAMS, G.N.; HIGGINS, M.J.; LEWEK, M.D. Aging skeletal muscle: physiologic changes and the effects of training. *Phys. Ther.*, v.82, p.62-68, 2002.

WILLIAMS, R.S.; NEUFER, P.D. Regulation of gene expression in skeletal muscle by contractile activity. In: ROWELL, L.B.; SHEPHERD, J.T. (Eds.). *Handbook of physiology: integration of motor, circulatory, respiratory and metabolic control during exercise*. Bethesda: American Physiology Society Book, 1996. p.1124-1150.

WEISS, A.; LEINW, L.A. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.12, p.417-439, 1996.

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

WINDISCH, A.; GUNDERSEN, K.; SZABOLCS, M.J.; GRUBER, H.; LOMO, T. Fast to slow transformation of enervated and electrically stimulated rat muscle. *J. Physiol.*, v.510, p.623-632, 1998.

WHITE, M.G.; SNOW, D.H. Quantitative histochemical study of glycogen depletion in the maximally exercised thoroughbred. *Equine Vet. J.*, v.19, p.67, 1987.

ZARUCCO, L.; TAYLOR, K.T.; STOVER, S.M. Determination of muscle architecture and fiber characteristics of the superficial and deep digital flexor muscles in the forelimbs of adult horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.65, p.819-828, 2004.

## **X. APÊNDICE**

Trabalho a ser enviado para a revista *Research in Veterinary Science*  
<http://ees.elsevier.com/rvsc>.

O guia de submissão para autores encontra-se disponível em:  
[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/623070/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623070/authorinstructions).