



**Maria João
Garrett Silveirinha
Sottomayor Neuparth**

**Contribuição das células precursoras miogénicas
para a plasticidade muscular esquelética no modelo
animal**



**Maria João
Garrett Silveirinha
Sottomayor Neuparth**

**Contribuição das células precursoras miogénicas
para a plasticidade muscular esquelética no modelo
animal**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor José Alberto Ramos Duarte, Professor Associado convidado da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Carlos Alberto Diogo Soares Borrego, Professor Catedrático do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

José Alberto Ramos Duarte, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade do Porto - co-orientador

Hans-Joachim Appell, Professor Catedrático da German Sport University

Félix Dias Carvalho, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Edgar Figueiredo da Cruz e Silva, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro - orientador

agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Amado e ao Professor Catedrático José Alberto Ramos Duarte, agradeço a inextinguível orientação científica que me proporcionaram, bem como as críticas construtivas e as oportunas sugestões que me colocaram ao longo deste percurso e que contribuíram de forma inequívoca para o meu enriquecimento científico. Gostaria ainda de agradecer a disponibilidade incondicional que demonstraram durante as correcções desta dissertação.

À Rita o meu profundo e sincero agradecimento pela ajuda constante e crucial ao longo destes três anos. As longas conversas com carácter bioquímico e a sua determinação no laboratório foram imprescindíveis para que eu levasse este trabalho até ao fim. Obrigada pela amizade sincera demonstrada ao longo destes anos.

Ao Zé e ao António a minha profunda gratidão pelo apoio, incentivo, mas particularmente, pela amizade demonstrada nas várias etapas deste meu percurso. A vossa ajuda nos protocolos experimentais, no trabalho laboratorial, nas sugestões e correcções, contribui de forma determinante para a realização desta tese.

Ao Rui pela amizade, disponibilidade e ajuda imprescindível na realização e análise dos géis 2D de proteínas de músculo que contribui de forma significativa para o enriquecimento desta trabalho.

À D. Celeste agradeço a forma dedicada e amiga com que sempre me tratou. Queria ainda agradecer a ajuda eficaz na preparação das amostras para a microscopia.

À Su, Ana Reis e Cristina Barros agradeço a forma simpática e amiga como me receberam na Universidade de Aveiro e a disponibilidade total demonstrada sempre que necessitei de ajuda.

Registo com orgulho a postura da minha irmã Francisca durante este meu percurso, ao assumir com coragem responsabilidades particularmente difíceis. Agradeço ainda o seu incentivo e a sua preocupação constante. À minha irmã Teresa, obrigada pelo apoio e pela ajuda prestada nos momentos mais complicados.

Ao meu Pai pelo carinho e por entender as minhas ausências mesmo quando mais precisou de ajuda

Ao Germano e ao Bernardo por terem sempre acreditado em mim ... pelo incentivo permanente, paciência demonstrada e pelo carinho que sempre me dedicaram. A vossa cumplicidade foi crucial nesta etapa da minha vida.

palavras-chave

células satélite, regeneração muscular, músculo esquelético, miosinas, plasticidade muscular, colchicina

resumo

O presente trabalho teve como objectivo geral verificar qual a contribuição das CS e de outras células *stem* musculares esqueléticas na plasticidade muscular. Para o alcançar, foram delineados três objectivos específicos: i) desenvolver uma metodologia fiável que permitisse avaliar células em proliferação na globalidade do tecido ii) estudar a evolução do processo de regeneração muscular com a utilização de marcadores bioquímicos e morfológicos de lesão/regeneração iii) verificar a existência de alterações na expressão de proteínas contrácteis e metabólicas no tecido muscular, após inibição de células em proliferação.

De forma a atingir o primeiro objectivo adaptou-se o método de *South Western* ao tecido muscular esquelético utilizando diferentes doses de BrdU e quantidades distintas de DNA. Esta metodologia mostrou-se mais sensível para a dose de 50 mg de BrdU/Kg e para 1 μ g de DNA. Adicionalmente, os valores de densidade óptica obtidos evidenciaram uma elevada correlação com o número total de núcleos marcados por imunohistoquímica.

Para alcançar o segundo objectivo, foi induzida lesão por esmagamento do *gastrocnemius* e estudou-se o processo de regeneração durante 20 dias, recorrendo a parâmetros bioquímicos (calpaínas, N-acetilglucosaminidase, mieloperoxidase, caspase-3, Bax, Bcl-2 e proliferação celular) e morfológicos (microscopia óptica e electrónica). Os resultados evidenciaram uma intensa proteólise nas fases iniciais, uma resposta inflamatória significativa aos 2º e 4º dias pós lesão e uma resposta apoptótica acentuada nas fases iniciais e finais do processo regenerativo. Relativamente à proliferação celular, esta foi mais evidente aos 4º e 6º dias pós lesão. Os dados morfológicos suportaram de forma coesa as alterações bioquímicas observadas.

Para dar resposta ao terceiro objectivo, avaliou-se a expressão de isoformas de miosinas de cadeia pesada e leve após lesão por esmagamento do *gastrocnemius*, em animais tratados e não tratados com colchicina. A colchicina inibiu a proliferação celular, não tendo sido, por isso, detectadas alterações fenóticas significativas ao longo do processo regenerativo em estudo.

Em suma, os dados obtidos neste trabalho sugerem que as CS e outras células *stem* musculares têm um papel fundamental nas alterações fenóticas observadas no músculo esquelético de ratinho após a indução de lesão por esmagamento.

keywords

satellite cells, muscle regeneration, skeletal muscle, myosin, muscular plasticity, colchicine.

abstract

The general purpose of this work consists of analyzing the contribution of SC and other muscular *stem* cells in muscular plasticity. To reach this objective, three specific purposes were drawn: i) to develop a reliable methodology that allows to assay proliferative cells in whole muscle tissue ii) to study the evolution of the muscle regeneration process using biochemical and morphological parameters iii) to analyze changes in the expression of skeletal muscle contractile and metabolic proteins after inhibition of cell proliferation.

To reach the first purpose, the *South Western* assay was adapted to skeletal muscle tissue using different doses of BrdU and distinct quantities of DNA. This methodology evidenced higher sensitivity to 50mg BrdU/Kg and to 1 μ g of DNA. Additionally, the optical density values obtained by this methodology showed a high correlation with the total number of immunohistochemically labelled nucleus.

To attain the second purpose, mice *gastrocnemius* muscle was injured by crush and the regeneration process was studied throughout 20 days using biochemical (calpains, N-acetyl-glucosaminidase, myeloperoxidase, caspase-3, Bax, Bcl-2 and cellular proliferation) and morphological (electron and light microscopy) parameters. The results of this study showed an intense proteolyses in the earlier phases, a significant inflammatory response on the 2nd and 4th days after damage, and a pronounced apoptotic response in the beginning and at the end of the regenerative process. The levels of cellular proliferation were higher in the 4th and 6th days after damage. The morphological findings were consistent with the observed biochemical alterations.

To achieve the third purpose, the expression of heavy and light myosin isoforms was studied after damage of *gastrocnemius* from animals treated and non-treated with colchicine. Colchicine administration inhibited cellular proliferation and thus, no significant phenotypic alterations were observed, namely myosin isoforms, during the considered regeneration period.

In summary, the data obtained in this study suggest the involvement of SC and other muscular *stem* cells on mice skeletal muscle phenotypic changes observed after trauma.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA MARCAR CÉLULAS SATÉLITE	5
2.1. Revisão da literatura	5
2.1.1. Origem embrionária do músculo esquelético	5
2.1.2. Identificação de células satélite	9
2.2. Material e Métodos	17
A – Protocolo experimental	17
A.1. - Avaliação de células mitoticamente activas por <i>South Western</i>	17
A.2. - Avaliação de células mitoticamente activas por Imunohistoquímica	19
2.3. Resultados	22
A.1. – Resultados referentes à metodologia de <i>South Western</i>	22
A.2. - Resultados referentes à imunohistoquímica	25
2.4. Discussão	29
III. REGENERAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA	35
3.1. Revisão da literatura	35
3.1.1. Aspectos morfológicos e moleculares associados à regeneração muscular	35
3.1.2. Modelos experimentais de indução de lesão	47
3.2. Material e Métodos	51
A – Protocolo experimental	51
A.1. Análise Bioquímica	51
A.1.1. Preparação de extractos de músculo esquelético	51
A.1.1.1. – Parâmetros Bioquímicos	52
A.2. Análise morfológica	55
3.3. Resultados	57
A.1. Resultados de parâmetros bioquímicos	57
A.2. Resultados referentes à análise morfológica	61
3.4. Discussão	72

IV. PLASTICIDADE MUSCULAR ESQUELÉTICA	83
4.1. Revisão da literatura	83
4.1.1. Heterogeneidade das fibras musculares	83
4.1.2. Plasticidade muscular	86
4.1.2.1. Vias de sinalização envolvidas nas alterações fenotípicas do tecido muscular esquelético	90
4.1.2.2. Células stem e plasticidade muscular	92
4.2 Material e Métodos	96
A – Protocolo experimental	96
A.1. - Avaliação de células mitoticamente activas por <i>South Western</i>	97
A. 2. - Separação das isoformas das cadeias pesadas de miosina por electroforese monodimensional	97
A.3. - Electroforese bidimensional (2D)	98
4.3. Resultados	100
A.1. Resultados referentes à metodologia de <i>South Western</i>	100
A. 2. Resultados referentes à análise por electroforese monodimensional de MHC	101
A. 3. Resultados referentes à análise proteica por electroforese bidimensional (2D)	102
4.4. Discussão	106
V. CONCLUSÕES	111
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

Índice de Figuras

- Figura 1** A,B) valores médios da densidade óptica (DO) em função da quantidade de DNA para diferentes doses de BrdU do grupo não submetido a exercício (A) e do grupo exercitado (B). C,D) Filme representativo do slot-blot referente à dose de 50 mg de BrdU para as diferentes quantidades de DNA aplicadas (0,2; 0,5 ;1; 2 e 5 µg) do grupo não submetido a exercício (C) e do grupo exercitado (D). 23
- Figura 2** A,B) curvas logarítmicas para os valores médios da densidade óptica (DO) versus quantidade de DNA, referentes às diferentes doses de BrdU aplicadas na membrana para o grupo não submetido a exercício físico (A) e para o grupo exercitado (B). 24
- Figura 3** comparação dos valores médios e respectivos desvios padrão das densidades ópticas (DO) do grupo não exercitado com o grupo exercitado para as diferentes quantidades de DNA aplicadas na membrana e para as diferentes doses de bromodeoxiuridina (BrdU). 25
- Figura 4** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal não exercitado injectado com 10 mg de BrdU e não sujeito a anticorpo primário (controlo negativo), onde são observadas fibras musculares sem marcação de mionúcleos ou núcleos intersticiais (ampliação original 625x). 26
- Figura 5** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do túbulo seminífero de um animal do grupo não exercitado, injectado com 5 mg de BrdU. É visível a incorporação de BrdU nos núcleos das espermatogonias e espermatócitos I e II assim como em algumas espermatides (ampliação original 2500x). 26
- Figura 6** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo não exercitado, injectado com 50 mg de BrdU, onde são observados numerosos núcleos marcados no interstício, de origem endotelial e não endotelial, assim como núcleos marcados à periferia de duas fibras musculares, provavelmente núcleos de células satélite (ampliação original 2500x). 27
- Figura 7** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo exercitado, injectado com 20 mg de BrdU, onde é evidente a grande quantidade de núcleos marcados quer no interstício quer na periferia das próprias fibras musculares (ampliação original 625x). 27
- Figura 8** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade das calpaínas por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais, em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 57
- Figura 9** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da mieloperoxidase por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais, em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 58

- Figura 10** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais, em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 58
- Figura 11** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da caspase-3 expressa pelo número de vezes acima do controlo, referente ao grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais, em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 59
- Figura 12** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão de densidade óptica (DO) do Bax e do Bcl-2, referente ao grupo controlo (C) e aos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 60
- Figura 13** A) Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão de densidade óptica referente a células marcadas com BrdU e relativos ao grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais, em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. B) Filme representativo do Western blotting para os diferentes momentos em que foram sacrificados os animais. 61
- Figura 14** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU e sacrificado aos 2 dias após lesão. A preparação não foi sujeita ao anticorpo primário (controlo negativo), razão pela qual é observada a ausência de marcação de mionúcleos ou de núcleos intersticiais (ampliação original 625x). 62
- Figura 15** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal de túbulos seminíferos de um animal do grupo controlo injectado com 50 mg de BrdU (controlo positivo), onde é observada a incorporação deste composto em núcleos de espermatogónias e espermatócitos (ampliação original 375x). 62
- Figura 16** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, sacrificado quatro dias após a indução de lesão muscular. É observada a incorporação de BrdU por três mionúcleos em posição central, por um núcleo de uma célula satélite e por um núcleo de uma célula endotelial. É ainda notória a presença de dois capilares sem qualquer marcação nuclear (ampliação original 2500x). 63
- Figura 17** Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU e sacrificado seis dias após lesão muscular. É notória a marcação acentuada de núcleos, quer de células intersticiais, endoteliais e não endoteliais, quer de células satélite (ampliação original 625x). 64
- Figura 18** Fotografia de microscopia óptica de um corte oblíquo do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, e sacrificado aos doze dias após a indução de lesão muscular. É evidente a incorporação de BrdU por células satélite e por células intersticiais de origem endotelial e, aparentemente, fibroblástica (ampliação original 2500x) 64
- Figura 19** Fotografia de microscopia óptica de um corte oblíquo do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, e sacrificado aos vinte dias após a indução de lesão muscular. É evidente a incorporação de BrdU apenas na célula endotelial (ampliação original 2500x). 65

- Figura 20** Recta de regressão linear entre núcleos totais marcados obtidos por imunohistoquímica e valores de densidade óptica obtidos pela técnica de *South Western* 67
- Figura 21** Fotografias de microscopia electrónica de um corte longitudinal (A) e transversal (B) do músculo *gastrocnemius* de dois animais controlo, evidenciando uma estrutura tecidual normal (ampliação original A: 12.500x; B: 20.000x). 67
- Figura 22** Fotografias de microscopia electrónica de cortes longitudinais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado às zero horas (A) e de outro aos dois dias (B) após a indução de lesão. É notória a perda de continuidade do sarcolema, a desorganização miofibrilar e o edema intracelular (A). Em B é evidente a perda de organização miofibrilar, por desnaturação proteica, o *swelling* mitocondrial, assim como a existência de grandes áreas de edema intracelular (ampliação original A: 8.000x; B: 20.000x). 68
- Figura 23** Fotografias de microscopia electrónica de cortes transversais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos quatro dias após a indução de lesão. Em A pode ser observado um fagócito e em B é evidente a existência de organelos e material intracelular no espaço intersticial assim como a existência de *swelling* mitocondrial e de um ligeiro edema intracelular difuso (ampliação original A: 16.000x; B: 10.000x). 69
- Figura 24** Fotografias de microscopia electrónica de cortes transversais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos quatro dias (A) e de outro aos seis dias (B) após a indução de lesão. Nas duas fotografias são notórios núcleos centrais com evidentes nucléolos, sugestivos de um intensa síntese proteica, e um ligeiro edema intracelular (ampliação original A: 8.000x; B: 12.500x). 70
- Figura 25** Fotografias de microscopia electrónica de um corte oblíquo (A) e de um corte transversal (B) do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos doze dias (A) e de outro aos dezasseis dias (B) após a indução de lesão. Nas duas fotografias é evidente a presença de grande quantidade de fibras de colagénio e a presença de um fibroblasto activo em B (ampliação original A: 5.000x; B: 12.500x) 71
- Figura 26** A) Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica, em relação ao respectivo músculo controlo, para os vários subgrupos experimentais com e sem administração de colchicina. B) Filme representativo do slot-blot para os diferentes momentos em que foram sacrificados os animais com (B1) e sem (B2) a administração de colchicina 100
- Figura 27** Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) em relação ao respectivo músculo controlo, para as diferentes isoformas de MHC correspondentes aos diferentes dias após a indução de lesão na ausência (A) e na presença (B) de colchicina. 101
- Figura 28** Gel 2D representativo do *gastrocnemius* de um animal injectado sem colchicina e extraído 18 dias pós lesão. (1- MLC1f 2- MLC2f 3- MLC3f 4- piruvato cinase 5- enolase) 102
- Figura 29** Gel 2D representativo do *gastrocnemius* de um animal tratado com colchicina e extraído 18 dias pós lesão. (1- MLC1f 2- MLC2f 3- MLC3f 4- piruvato cinase 5- enolase) 103

Figura 30 Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) relativa aos músculos controlo para as diferentes isoformas de MLC3f (A), MLC1f (B), para a relação $MLC3f/(MLC3f+MLC1f)$ (C) e para a isoforma MLC2f (D) ao longo dos vários momentos após a indução de lesão na ausência e na presença de colchicina.

104

Figura 31 Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) das enzimas metabólicas enolase (A) e piruvato cinase (B) do músculo *gastrocnemius* extraídos dos animais tratados com e sem colchicina ao longo dos vários momentos após lesão

105

Índice de Tabelas

- Tabela 1** - valores médios \pm desvio padrão (DP) de densidade óptica do grupo não exercitado, para cada uma das quantidades de DNA aplicadas na membrana de nitrocelulose, em ratinhos que foram previamente injectados com 5, 10, 20 e 50 mg de bromodeoxiuridina (BrdU)/Kg de peso de rato. 22
- Tabela 2** - valores médios \pm desvio padrão (DP) de densidade óptica do grupo submetido a exercício físico, para cada uma das quantidades de DNA aplicadas na membrana de nitrocelulose, em ratinhos que foram previamente injectados com 5, 10, 20 e 50 mg de bromodeoxiuridina (BrdU)/ Kg de peso de rato. 23
- Tabela 3** - valores médios e respectivos desvios padrão (DP) da percentagem de núcleos com origem endotelial, intersticial não endotelial, nas células satélite e em posição central nas fibras musculares, relativamente ao total de núcleos que incorporaram bromodeoxiuridina BrdU, nos grupos não exercitado e exercitado, em ratinhos previamente injectados com 50 mg de BrdU/Kg de peso de rato. 28
- Tabela 4** - valores médios \pm desvio padrão (DP) da razão Bax/Bcl-2 para o grupo controlo (C) e para os vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*. 60
- Tabela 5** - valores médios \pm desvio padrão (DP) da percentagem de núcleos com origem endotelial, intersticial não endotelial, nas células satélite e em posição central nas fibras musculares, relativamente à totalidade de núcleos marcados com BrdU, nos animais do grupo controlo e do grupo experimental nos diferentes momentos de avaliação após a indução de lesão. 66

Lista de Abreviaturas

AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de variância
APS	<i>Ammonium persulphate</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína anti-apoptótica Bax
Bcl-2	Proteína pró-apoptótica Bcl-2
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
BrdUTP	Bromodeoxiuridina -trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Cdks	Cinases dependentes de ciclinas
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CPMs	Células precursoras miogénicas
CS	Células satélite
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
ECBF	Estimulação crónica de baixa frequência
EDL	Músculo <i>Extensor Digitorum Longus</i>
EDTA	<i>Ethylenodiaminetetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
EROs	Espécies reactivas de oxigénio
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FasL	Ligando Fas
FGF	Factor de crescimento fibroblástico
FRMs	Factores reguladores miogénicos
HGF	Factor de crescimento tipo hepatócito
³ H – TdR	Timidina tritiada
i.p.	intraperitoneal
IGF-I	Factor de crescimento tipo insulínico-I

IL-6	Interleucina 6
JNK	Jun N-terminal kinases
LIF	Factor inibidor leucémico
MAPK	<i>Mitogen - activated protein kinase</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
MHC	Miosina de cadeia pesada
Miogenina	Factor de transcrição da família MyoD
MHCemb	Forma embrionária de miosina de cadeia pesada
MHCfetal	Forma fetal de miosina de cadeia pesada
MLC	Miosina de cadeia leve
MLC1 e MLC3	Miosinas de cadeia leve essenciais
MLC2	Miosina de cadeia leve reguladora
MPO	Mieloperoxidase
MRF4	Factor de transcrição da família MyoD
Myf5	Factor de transcrição da família MyoD
MyoD	Factor de transcrição da família MyoD
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
MST1	<i>Mammalian sterile twenty-like kinase</i>
NAG	N-acetilglucosaminidase
NCAM	Molécula de adesão neural
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
Pax	<i>Paired box transcription factors</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Factor</i>
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas
pl	Ponto isoelétrico
pRb	Proteína retinoblastoma
RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
rpm	rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida com SDS
SP	<i>Side population</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TDT	<i>Terminal desoxinucleotidil transferase</i>

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylenediamine
TGF- β	Factor de crescimento transformador β
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
Vmax	Velocidade máxima de encurtamento das fibras

I. Introdução

O músculo esquelético adulto é um dos poucos tecidos capazes de regenerar de forma eficiente em resposta a uma lesão extensa (Hawke e Garry 2001; Goetsch *et al.* 2003). Uma vez que as fibras musculares adultas são células pós mitóticas incapazes de se dividir, essa capacidade de auto-reparação tem sido atribuída a uma população de células indiferenciadas, designadas por células satélite (CS) (Renault *et al.* 2000; Hawke e Garry 2001; Goetsch *et al.* 2003). Embora a origem exacta destas células mononucleares seja ainda desconhecida, sabe-se que elas surgem durante o processo de miogénese como uma sub-população de mioblastos que não é incorporada nos sincícios em desenvolvimento, mas que está associada à superfície de todas as fibras musculares (Schultz 1989). Esta população de células encontra-se presente durante toda a vida, em todas as fibras musculares, desempenhando um papel determinante no crescimento pós-natal e na regeneração muscular (Schultz 1989). No músculo adulto, as CS encontram-se normalmente quiescentes, i.e., em fase G0 do ciclo celular, sendo activadas por várias formas de agressão muscular, incluindo estímulos físicos, químicos e térmicos (Barjot *et al.* 1998; Charge e Rudnicki 2004). Uma vez activadas, estas células

dividem-se assimetricamente para gerar novas CS e múltiplas células precursoras miogénicas activadas (mioblastos). Após diferenciação, os mioblastos fundem-se entre si ou com a fibra muscular adjacente, aumentando o número de mionúcleos essenciais ao processo de reparação muscular (Maier e Bornemann 1999; Sabourin e Rudnicki 2000; Morgan e Partridge 2003). As células satélite activas expressam os factores de transcrição Myf5 e MyoD e, uma vez diferenciadas, expressam Miogenina e MRF4. A expressão destes factores reguladores miogénicos (FRMs) durante a activação, proliferação e diferenciação das células satélite é análoga à que ocorre durante a embriogénese (Seale e Rudnicki 2000; Morgan e Partridge 2003). Também as fibras regeneradas repetem a sequência de transições de isoformas que ocorrem no músculo embrionário. Os miotúbulos jovens expressam, por exemplo, formas embrionárias de miosina de cadeia pesada (MHCemb), seguido em sequência pela expressão de MHC fetal e, finalmente, isoformas de MHC adultas (Carlson 2001). Baldwin e Haddad (2001), referem que a síntese destas proteínas, típicas do período de vida embrionário, se deve à adição de núcleos pelas células satélite activas, uma vez que este tipo de proteínas não é detectado em músculos maduros intactos. Embora não existam praticamente estudos que relacionem estas células precursoras com a plasticidade muscular, existem inúmeras evidências passíveis de levantar questões sobre este polémico tema. O facto de durante o processo regenerativo as CS indiferenciadas se fundirem às fibras adjacentes, contribuindo com mionúcleos e material genético (Hawke e Garry 2001) e de, conseqüentemente, surgirem na fibra muscular regenerada proteínas típicas do período embrionário (Putman *et al.* 2000), sugere que as células satélite poderão ter um papel importante na plasticidade muscular. É também de salientar que, no decurso do processo de regeneração muscular esquelética, surge com frequência uma grande quantidade de fibras híbridas que, podendo mesmo exceder a quantidade de fibras puras presentes (Pette 2002), reflecte a heterogeneidade na composição de fibras musculares, possivelmente resultante da adição de mioblastos durante o processo de regeneração. Hoje em dia é inquestionável que, decorrente da habilidade das fibras musculares ajustarem o seu fenótipo em resposta a estímulos mecânicos, neurais e hormonais (Sullivan *et al.* 1995; Haddad *et al.* 1997), o músculo esquelético apresenta um grande potencial adaptativo (Pette 2002) e que estas alterações adaptativas na expressão miofibrilar resultam de transformações reversíveis nas isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC).

Contrariando a hipótese anteriormente apresentada de que as CS poderão ter um papel decisivo na plasticidade muscular, alguns estudos que recorrem ao uso de radiações com o intuito de destruir qualquer tipo de células precursoras miogénicas (células *stem*), atribuem aos núcleos das fibras maduras esse potencial adaptativo (para refs ver Allen *et al.* 1999). Os resultados destes estudos revelaram que, mesmo na hipotética ausência de células satélite, ocorrem alterações fenóticas nos músculos submetidos a estímulos, o que evidencia a capacidade adaptativa do tecido (para refs. ver Allen *et al.* 1999). De forma idêntica, Rosenblatt *et al.* (1994) mostraram que em resposta a estímulos de sobrecarga no músculo *extensor digitorum longus* (EDL), miofibras sujeitas a radiação não sofrem hipertrofia ou aumento do número de mionúcleos mas alteram o seu perfil de expressão de isoformas de MHC de rápidas para lentas.

No entanto, esta hipótese é posta em causa por outros trabalhos (Phelan e Gonyea 1997) cujos resultados demonstraram, claramente, que a activação e proliferação das células miogénicas precursoras é apenas parcialmente, mas não inteiramente, inibida pela radiação. Os mesmos autores referem ainda a presença de formas embrionárias de MHC e do factor de crescimento tipo insulínico (IGF-I) nos músculos submetidos a sobrecarga e a radiações. Adicionalmente, Morgan e Patridge (2003) sugerem que no músculo esquelético existe uma população de células *stem* que resiste à radiação e, por isso, pode ter um papel importante no processo regenerativo. De forma idêntica, Zammit e Beauchamp (2001) sugerem a presença no músculo esquelético de dois tipos de CS, i.e., uma maioria que é sensível à radiação e responsável pelo crescimento e pelo processo regenerativo e uma minoria de CS que é resistente à radiação mas mobilizada em casos de uma lesão extensa. Por outro lado, a existência no músculo esquelético de outras células *stem* para além das CS, tem igualmente sido considerada (Goldring *et al.* 2002; O'Brien *et al.* 2002; Huard *et al.* 2003). Ferrari *et al.* (1998) mencionam que células *stem* derivadas de tecidos extramusculares podem ser incorporadas no tecido muscular esquelético, estando assim disponíveis para a regeneração do tecido. A noção de que as células *stem* existentes nos tecidos maduros são unipotentes e se diferenciam apenas no tipo celular ao qual estão associadas, tem também sido posta em causa (Asakura 2003). Evidências recentes sugerem que estas células progenitoras podem ser reprogramadas por sinais extrínsecos ou intrínsecos (Joshi e Enver 2002), podendo assim gerar tipos celulares característicos de outros tecidos. De facto, e como exemplo, estudos recentes *in vitro* demonstraram que as CS são capazes de se diferenciar em osteócitos e adipócitos (Asakura *et al.* 2001; Wada *et al.* 2002) após tratamento com proteínas morfogénicas do osso ou indutores adipogénicos, respectivamente.

Uma vez que a utilização de radiações com o intuito de inibir a proliferação de células *stem* tem levado a resultados contraditórios, tornou-se necessária a utilização de outro meio de inibição da activação deste tipo de células, de forma a obter resultados mais conclusivos sobre o seu papel na plasticidade muscular esquelética. Neste sentido, uma alternativa à aplicação de radiações, baseia-se no uso de agentes anti-neoplásicos como, por exemplo, a colchicina. Este fármaco é um alcalóide que actua durante a fase M do ciclo celular ligando-se aos fusos mitóticos, resultando na inibição da formação de microtúbulos e, conseqüentemente, na interrupção do processo de mitose (Khan 1995).

Tendo em conta os pressupostos teóricos acima apresentados bem como os problemas levantados, este trabalho tem por objectivos gerais: a) desenvolver metodologias que permitam a identificação de células em proliferação no músculo esquelético; b) caracterizar as alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem durante os primeiros 20 dias do processo regenerativo; c) verificar, qual o comportamento das CS e analisar as alterações fenotípicas, particularmente nas isoformas de MHC e de miosinas de cadeia leve (MLC), após inibição das células *stem* com colchicina.

II. Metodologias utilizadas para marcar células satélite

2.1. Revisão da literatura

2.1.1. Origem embrionária do músculo esquelético

Os mecanismos morfológicos e moleculares que ocorrem durante a regeneração muscular são bastante similares aos ocorridos durante o desenvolvimento do músculo esquelético (para refs ver Hawke e Garry 2001). Assim sendo, embora existam evidências de que o processo regenerativo seja mais complexo, a análise dos fenômenos subjacentes à formação do músculo esquelético será imprescindível na compreensão dos mecanismos associados ao processo regenerativo. Nos vertebrados, o músculo esquelético forma-se a partir de células progenitoras presentes num par de sómitos situados em cada um dos lados do tubo neural e da corda dorsal (Buckingham 2001; Buckingham *et al.* 2003; Zhao e Hoffman 2004). As células precursoras miogénicas (CPMs) foram primeiro identificadas no dermomiótomo, uma camada epitelial localizada no compartimento dorsal do sómito (Chen e Goldhamer 2003). A especificação da linhagem miogénica por estas células precursoras resulta de sinais provenientes de

estruturas adjacentes, tais como o tubo neural, a corda dorsal, a ectoderme e a aorta (Munsterberg e Lassar 1995). Efectivamente, a libertação de moléculas de sinalização pelas estruturas contíguas inicia a expressão de genes específicos para a formação do tecido muscular esquelético. De facto, nas fases iniciais da embriogénese, as CPMs expressam, entre outros factores, o factor de transcrição Pax-3 e Pax-7 (paired box transcription factors) e o receptor tirosina cinase c-met. Alguns autores (Maroto *et al.* 1997; Tajbakhsh *et al.* 1997; Borycki *et al.* 1999) referem ainda que o factor Pax-3 desencadeia a activação de outros factores reguladores miogénicos tais como Myf5 e MyoD, funcionando assim como um regulador importante na progressão da miogénese. Adicionalmente, alguns estudos mostraram que, em ratos mutados em genes que codificam para c-met (Dietrich *et al.* 1999) ou para Pax-3 (Borycki *et al.* 1999), as CPMs não migram, o que resulta na perda total de massa muscular nos membros destes animais. Pelo contrário, a expressão exagerada de Pax-3 em culturas de mioblastos inibe a diferenciação terminal *in vitro* e, conseqüentemente, a formação do músculo esquelético (Sabourin e Rudnicki 2000).

A indução da expressão de genes que codificam para os FRMs pertencentes à família MyoD (Myf5, MyoD) é fundamental para a determinação miogénica. Efectivamente, a especificação da linhagem miogénica requer a sobre-regulação dos genes que codificam para Myf5 e MyoD. Este facto é demonstrado pela perda total de massa muscular, devido à ausência de uma população de mioblastos, em ratinhos duplamente mutados nos genes *myf5* e *myoD* (Rudnicki *et al.* 1993). De facto, na ausência dos factores Myf5 e MyoD, as células do sómito, que normalmente originam os mioblastos, não se localizam correctamente e adoptam outros destinos celulares (Buckingham *et al.* 2003). Por outro lado, a expressão dos FRMs, Miogenina e MRF4 ocorre quando as células precursoras abandonam o ciclo celular e se diferenciam, originando miotúbulos e posteriormente fibras musculares maduras multinucleadas (Stockdale 1992; Shen *et al.* 2003). No decurso da diferenciação muscular *in vivo*, estes FRMs são expressos numa sequência definida: Myf5 e MyoD são expressos pelos mioblastos em proliferação, enquanto que a expressão de Miogenina só é induzida na diferenciação muscular (Smith *et al.* 1994). Por seu lado, o MRF4 é expresso nas fases finais do desenvolvimento muscular (Hinterberger *et al.* 1991). Sendo específicos do músculo esquelético e responsáveis pela sua identidade mioblástica e pela diferenciação terminal das fibras musculares (Molkentin e Olson 1996), a expressão destes factores de transcrição em linhas celulares não

musculares é suficiente para induzir a diferenciação miogénica dessas células (Wright *et al.* 1989; Molkentin e Olson 1996).

Estes FRMs mostram homologia dentro do domínio básico e possuem uma região adjacente *helix-loop-helix*, sendo frequentemente designados por proteínas bHLH (Molkentin e Olson 1996). A activação da expressão de genes musculares por estes FRMs é dependente da sua associação com outras proteínas bHLH, tais como as proteínas E e as proteínas pertencentes à família MEF2 (myocyte enhancer factor-2) (Puri e Sartorelli 2000; Sabourin e Rudnicki 2000). Efectivamente, a família de factores de transcrição MEF2 contém um domínio MADS N-terminal que permite a dimerização com as proteínas miogénicas da família MyoD (Wang *et al.* 2001; McKinsey *et al.* 2002). Estes heterodímeros ligam-se canonicamente a sequências CANNTG do DNA (E-Box), as quais são encontradas nas regiões promotoras ou *enhancers* de muitos genes específicos do músculo esquelético (Sabourin e Rudnicki 2000; Wang *et al.* 2001). No entanto, a exemplo dos FRMs, os factores de transcrição pertencentes à família MEF2, por si só, também não induzem a expressão dos genes específicos do músculo esquelético, mas potenciam a acção miogénica dos FRMs pertencentes à família MyoD (Shen *et al.* 2003). De forma idêntica, a expressão de genes que codificam para proteínas musculares requer também a ligação de proteínas E (E12 e E47) aos factores reguladores miogénicos da família MyoD (Sabourin e Rudnicki 2000).

Por outro lado, os FRMs podem ser regulados de forma negativa por proteínas HLH, designadas de proteínas Id, nas quais está ausente o domínio básico de ligação ao DNA (Lassar *et al.* 1991; Carlsen e Gundersen 2000; Sabourin e Rudnicki 2000). De facto, os factores Id podem formar heterodímeros com as proteínas E, impedindo a sua associação com os FRMs e subsequente a activação dos genes específicos do tecido muscular (Puri e Sartorelli 2000). Existem várias evidências de que as proteínas Id têm um papel importante na regulação da proliferação celular. A expressão do gene que codifica para a proteína Id é aumentada em resposta a um estímulo mitogénico e está associada com a indução de síntese de DNA (Alway *et al.* 2002). Pelo contrário, a expressão da proteína Id é rapidamente sob-regulada com a indução da diferenciação miogénica, libertando as proteínas E de forma a estarem disponíveis para formar heterodímeros com os FRMs (Gao *et al.* 2001) e de, conseqüentemente, ocorrer a expressão dos genes que codificam para proteínas musculares.

A actividade dos FRMs é também fortemente associada à regulação do ciclo celular (Lassar *et al.* 1994). A progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular é controlada pelas Cdk's (cinases dependentes de ciclinas) que medeiam a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), permitindo a libertação do factor de transcrição E2F. Especificamente, no início da fase G1, a formação do complexo ciclina D1-Cdk4 é activado por um estímulo mitogénico e fosforila pRb, levando à expressão da ciclina E. Seguidamente, a formação do complexo ciclina E-Cdk2 promove a hiperfosforilação da pRb permitindo a completa libertação de E2F e a expressão dos genes necessários para a replicação do DNA, estimulando a progressão do ciclo celular (Puri e Sartorelli 2000; Shen *et al.* 2003). O factor E2F liga-se às regiões promotoras de genes envolvidos na síntese de DNA, tais como o gene que codifica para a DNA polimerase α (Sellers *et al.* 1998). A pRb regula a progressão do ciclo celular através da sua ligação ao factor E2F, impedindo a progressão para a fase S do ciclo celular e promovendo a diferenciação terminal com activação de factores de transcrição como o factor MyoD (Sellers *et al.* 1998).

A ciclina D1 pode ser importante na manutenção do factor MyoD num estado inactivo. De facto, a expressão excessiva desta ciclina inibe a actividade do factor MyoD e, consequentemente, a sua ligação a genes que transcrevem para proteínas musculares (Puri e Sartorelli 2000; Sabourin e Rudnicki 2000). Adicionalmente, a actividade do factor MyoD é altamente afectada por interacção directa com o domínio C-terminal da Cdk4. A formação do complexo MyoD-Cdk4 inibe a função do factor MyoD de induzir a expressão de genes específicos do tecido muscular, comprometendo assim a diferenciação celular (Zhang *et al.* 1999).

A passagem dos mioblastos a um estado de diferenciação terminal requer a saída do ciclo celular. O factor de transcrição MyoD pode promover a saída do ciclo celular através da indução da expressão de inibidores de Cdk's tais como a p21, a p27 e a p57. O gene que transcreve para a p21 é activado pela expressão exacerbada de MyoD e está correlacionado com a sobre-regulação da Miogenina durante a embriogénese. A expressão do factor p21 inibe a fosforilação da pRb favorecendo a saída do ciclo celular (White *et al.* 2002). Também o aumento dos níveis deste factor é requerido para a manutenção de um estado pós mitótico pela célula (Shen *et al.* 2003).

A formação do músculo esquelético é, pois, um processo de múltiplas etapas que envolve a determinação das células mesodérmicas com o intuito de originar mioblastos, o abandono do ciclo celular pelos mioblastos e a conseqüente diferenciação em miofibras multinucleadas (Shen *et al.* 2003). As miofibras primárias multinucleadas formam-se aproximadamente 13 dias *postcoitum* (E13) no embrião de ratinho. Por seu lado, as miofibras secundárias formam-se paralelamente às primárias e constituem as miofibras predominantes durante as fases finais da embriogénese, surgindo 15 a 16 dias *postcoitum* (E15-E16). Efectivamente, diversos estudos sugerem que linhagens distintas de mioblastos são responsáveis pela formação destas miofibras; ou seja, os mioblastos embrionários originam as miofibras primárias, enquanto que os mioblastos fetais geram as miofibras secundárias (Hawke e Garry 2001; Tajbakhsh 2003). Estes dois tipos de miofibras musculares diferem também, entre si, no desenvolvimento temporal, no tamanho, no número e na expressão de isoformas de MHC (Miller *et al.* 1999). No final da embriogénese e no início do período pós natal, surge uma outra sub-população de mioblastos, denominadas de CS, que não se diferencia, mantendo-se associada à superfície das fibras musculares e desempenhando o papel de células *stem* do músculo esquelético (Charge e Rudnicki 2004), sendo as responsáveis pelo crescimento pós natal (McCormick e Thomas 1992).

2.1.2. Identificação de células satélite

A identificação de CPMs, nomeadamente as células satélite, é de extrema importância na compreensão dos fenómenos associados ao desenvolvimento muscular esquelético pós-natal e ao processo regenerativo. Por isso, vários investigadores (para refs. ver Lawson-Smith e McGeachie 1998) têm realizado esforços no reconhecimento de marcadores para a identificação deste tipo celular.

As CS foram descobertas por Mauro (1961) em músculos de rã, sendo assim designadas devido à sua localização satélite, entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares esqueléticas. O número de CS associado às fibras musculares depende da espécie, da idade (Dedkov *et al.* 2003) e do tipo de fibra muscular (Hawke e Garry 2001; Jejurikar e Kuzon Jr 2003). Por exemplo, num rato recém-nascido, as CS constituem cerca de 30 % de núcleos sub-laminares, enquanto que num rato adulto a percentagem deste tipo de células decresce bruscamente, constituindo apenas 5% da totalidade de

núcleos (Seale e Rudnicki 2000; Seale *et al.* 2000; Charge e Rudnicki 2004). Esta diminuição do número de CS deve-se principalmente ao aumento acentuado do número de mionúcleos ocorrido após fusão das CS durante o crescimento pós-natal. Adicionalmente, a quantidade deste tipo de células varia com o tipo de fibra à qual se encontram associadas, e.g., a percentagem de CS no músculo *soleus* adulto, constituído principalmente por fibras tipo I, é cerca de duas a três vezes superior à do *tibialis anterior* ou do músculo EDL (Charge e Rudnicki 2004), constituído essencialmente por fibras tipo II. Parece, por isso, existir uma relação entre a quantidade de CS e as características metabólicas das fibras musculares às quais as CS se encontram associadas. Também o aumento da densidade de CS tem sido demonstrado em associação com a proximidade de capilares e das junções neuro-musculares (Phillips e Knighton 1990; Umnova e Seene 1991; Vierck *et al.* 2000). Desta forma, as fibras oxidativas, caracterizadas por um aumento da densidade neuro-motora e por maior capilarização do que as fibras glicolíticas, apresentam maior número de CS (Hawke e Garry 2001).

No músculo adulto, as CS encontram-se normalmente quiescentes, ou seja, na fase G0 do ciclo celular (Kuschel *et al.* 1999). O número de CS no estado quiescente mantém-se relativamente constante após vários ciclos de degeneração/regeneração (Jejurikar e Kuzon Jr 2003), sugerindo um mecanismo de auto-renovação pelas próprias CS (Sabourin e Rudnicki 2000; Seale *et al.* 2000; Asakura *et al.* 2002). Este tipo de células precursoras pode ser facilmente identificado ao microscópio electrónico devido quer à sua posição anatómica, quer às suas características morfológicas. De facto, por se encontrarem no estado G0 do ciclo celular e assim serem metabolicamente pouco activas (Hawke e Garry 2001; Charge e Rudnicki 2004; Wozniak *et al.* 2005), as CS são caracterizadas por núcleos ricos em heterocromatina e por citoplasmas de reduzidas dimensões, contendo apenas um pequeno número de organelos (Allen e Rankin 1990; Schultz e McCormick 1994; Charge e Rudnicki 2004).

No entanto, quando sujeitas a estímulos apropriados, as CS proliferam, diferenciam-se e fundem-se, adicionando mionúcleos às fibras musculares diferenciadas tendo, assim, um papel determinante no crescimento pós-natal e na regeneração muscular (Kuschel *et al.* 1999; Seale e Rudnicki 2000; Asakura *et al.* 2001). Associado a este aumento da actividade mitótica das CS ocorre uma redução da heterocromatina, um aumento da razão citoplasma/núcleo e do número de organelos intracelulares (McFarland 1999).

A identificação de CS recorrendo à microscopia óptica tem sido prática corrente, sobretudo com recurso à imunohistoquímica (Hawke e Garry 2001). A utilização de anticorpos específicos para proteínas existentes ou expressas em determinadas etapas do ciclo celular nas CS tem permitido a identificação e quantificação deste tipo de células precursoras. A descoberta de proteínas expressas pelas CS, mas ausentes nos mionúcleos pós-mitóticos das fibras musculares, têm facilitado essa tarefa (Morgan e Partridge 2003). No entanto, vários destes anticorpos marcam simultaneamente, quer células satélite quiescentes, quer em proliferação, não fornecendo uma noção exacta da quantidade de CS que se encontra activa. Como exemplo, marcadores da superfície celular como o receptor tirosina cinase c-met, as moléculas de adesão celular M-caderina, as VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e as NCAM (molécula de adesão neural) são expressos simultaneamente em CS quiescentes e em proliferação (para refs ver Hawke e Garry 2001). A c-met é o receptor para o factor de crescimento HGF (factor de crescimento tipo hepatócito) (Cornelison e Wold 1997; Seale e Rudnicki 2000), sendo este factor, um potente agente mitogénico para as CS e importante para a sua migração. A M-caderina, a VCAM-1 e a NCAM são moléculas de adesão celular que colectivamente parecem ter um papel importante, quer na adesão das CS à lâmina basal da miofibrila, quer na migração destas células em resposta a diferentes estímulos. Vários estudos (Cornelison e Wold 1997; Beauchamp *et al.* 2000; Hollnagel *et al.* 2002; Dedkov *et al.* 2003) têm utilizado a M-caderina para marcar CS. Esta molécula de adesão celular, dependente das concentrações de cálcio adjacente, é expressa apenas numa subpopulação de células satélite quiescentes (cerca de 20%) contudo, ocorre um aumento acentuado da sua expressão quando as CS se tornam activas. Esta proteína parece ter um papel importante no alinhamento e fusão dos mioblastos para originar miotúbulos (Cornelison e Wold 1997; Beauchamp *et al.* 2000). Nas miofibrilas maduras após a formação completa dos miotúbulos, a expressão de M-caderina é sob-regulada, mas esta proteína mantém-se presente nas células satélite quiescentes (Hollnagel *et al.* 2002).

Adicionalmente, outras proteínas como os factores de crescimento Pax-3, Pax-7 e MNF (*myocyte nuclear factor*) são expressas igualmente, quer nas CS quiescentes, quer nas activas. O factor de transcrição Pax-7 está relacionado com o factor Pax-3 dada a alta similaridade das suas estruturas proteicas e do padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário (Maroto *et al.* 1997). Seale *et al.* (2000), isolaram Pax-7 como o factor especificamente expresso em culturas de CS e demonstraram a sua expressão quer em CS quiescentes quer em activas. Os mesmos autores analisaram

músculos esqueléticos de animais *Knockout pax 7* (*pax7^{-/-}*) e verificaram que estes eram desprovidos de CS o que sugere que este factor de transcrição é essencial para a formação deste tipo de células precursoras. Estes ratos exibiram deficiência muscular severa à nascença e ausência de CS, não sobrevivendo, por isso, mais de duas semanas após o nascimento (Seale *et al.* 2000). Importa, no entanto, referir que a expressão do gene que codifica para o Pax-7 diminui acentuadamente com a sobre-regulação dos genes que codificam para os FRMs, Miogenina e MRF4. Por outro lado, o MNF, para além de ser expresso nas CS quiescentes, é igualmente sintetizado após lesão muscular, quer nas células precursoras em proliferação, quer nas miofibras recém formadas. Contudo, a sua expressão diminui acentuadamente com o amadurecimento das fibras musculares (Garry *et al.* 1997). A deleção do gene que codifica para este factor resulta numa regeneração ineficiente e é acompanhada por acumulação de células adiposas (Chen e Goldhamer 2003).

A marcação de células satélite, sobretudo no seu estado activo, é de extrema importância na compreensão do processo regenerativo do tecido muscular esquelético após distintos estímulos lesivos. Por isso, vários marcadores para este tipo de células em proliferação têm sido utilizados, nomeadamente os factores reguladores miogénicos da família MyoD, a desmina e os marcadores de proliferação celular.

A identificação de células satélite mitoticamente activas através da expressão dos FRMs pertencentes à família MyoD, tem sido frequentemente utilizada recorrendo sobretudo a metodologias como a imunohistoquímica (Miller *et al.* 2000; Asakura *et al.* 2001), a imunofluorescência (Maier *et al.* 2002) e o *Northen blotting* (Marsh *et al.* 1997). A expressão dos factores reguladores miogénicos durante a activação das CS é análoga à manifestada durante o desenvolvimento do músculo esquelético (Seale e Rudnicki 2000). Sob exposição a sinais provenientes do músculo lesado, as CS quiescentes, que não expressam níveis detectáveis de FRMs, são activadas e começam a proliferar, sendo muitas vezes referidas como mioblastos. A nível molecular, a activação das CS é caracterizada por uma sobre-regulação dos FRMs, Myf5 e MyoD (Grounds 2002). A expressão dos factores Myf5 e MyoD subsequentes à lesão muscular tem sido observada em vários modelos de regeneração muscular *in vivo* e em vários tipos de músculos. Por exemplo, Cooper *et al.* (1999) confirmaram a sobre-regulação inicial de Myf5 ou de MyoD e a posterior co-expressão de ambos os factores durante a regeneração muscular induzida por cardiotoxina. Para além disso, com o intuito de verificar, em particular, a importância do factor de transcrição MyoD na regeneração muscular, Megeney *et al.*

(1996) verificaram que em ratos MyoD^{-/-} o processo regenerativo originou um elevado número de células precursoras miogénicas e um reduzido número de miotúbulos diferenciados. A elevada quantidade de CS observada nos animais MyoD^{-/-} sugere que estas células estão incapacitadas de prosseguir o programa de diferenciação e, em vez disso, participam na sua auto-renovação (Sabourin e Rudnicki 2000). De acordo com o referido anteriormente no que diz respeito ao processo de embriogénese, após proliferação das células precursoras miogénicas, a expressão dos factores Miogenina e MFR4 é igualmente sobre-regulada (Wozniak *et al.* 2005), sendo expressos após a saída do ciclo celular, não devendo, por isso, ser utilizados como marcadores de células mitoticamente activas.

Outro marcador habitualmente utilizado na marcação destas células precursoras miogénicas é a desmina. A desmina é uma proteína encontrada nos filamentos intermediários do citoesqueleto das células musculares. Na miogénese, esta proteína é expressa nos mioblastos em proliferação antes da sua fusão para formar os miotúbulos (Lawson-Smith e McGeachie 1998; O'Brien *et al.* 2002). Contudo, após fusão dos mioblastos a desmina acumula-se e torna-se mais organizada.

A identificação e a quantificação de CS activas têm sido efectuadas com recurso a marcadores de proliferação celular, como o PCNA (*proliferating cell nuclear factor*), a BrdU (bromodeoxiuridina) e a timidina tritiada (³H – TdR). No entanto, estes marcadores sinalizam não só as células precursoras miogénicas, como também todas as células em proliferação localizadas no espaço intersticial, de que são exemplo os fibroblastos, as células endoteliais e as células sanguíneas.

O método clássico utilizado durante décadas para marcar células mitoticamente activas baseia-se na utilização de isótopos radioactivos como por exemplo a ³H – TdR em combinação com a técnica de autoradiografia (McCormick e Thomas 1992; Mozdziak *et al.* 2000). No entanto, este método marca todas as células em divisão somente após as secções de tecido serem expostas à emulsão autoradiográfica durante várias semanas (Lawson-Smith e McGeachie 1998), o que, para além de outras limitações, acarreta muito tempo requerido para a sua execução. Assim sendo, e com o intuito de ultrapassar os inconvenientes impostos pelo uso da autoradiografia, outras técnicas foram desenvolvidas e outros marcadores de proliferação celular começaram a ser utilizados. Efectivamente, a imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para a BrdU e o PCNA, (Lawson-Smith e McGeachie 1998) tem sido hoje em dia bastante utilizada na

visualização de células em proliferação. Estes marcadores de proliferação celular comparativamente à ^3H – TdR são menos tóxicos, não radioactivos (Mozdziak *et al.* 2000) e podem ser utilizados em combinação com outros anticorpos facilitando a localização das células precursoras miogénicas (Lawson-Smith e McGeachie 1998). Adicionalmente, estes marcadores permitem ainda utilizar técnicas de coloração que definem a estrutura e os limites da fibra muscular, o que não é possível com o uso da autoradiografia (Brotchie *et al.* 1995).

O PCNA é uma proteína auxiliar da polimerase δ que é expressa nas células durante a fase S do ciclo celular (Lawson-Smith e McGeachie 1998; Putman *et al.* 2000). O PCNA é detectado com recurso ao anticorpo específico (anti-PCNA) sendo posteriormente visualizado através da imunohistoquímica ou imunofluorescência (Lawson-Smith e McGeachie 1998). Na literatura, a utilização do PCNA com o intuito de marcar células satélite em proliferação tem sido observada em diversos estudos de desnervação (Kuschelet *et al.* 1999), bem como, de lesão induzida por trauma físico (Kami e Senba 2002). No entanto, a BrdU é o marcador de proliferação celular mais utilizado e referido na literatura. De facto, vários estudos (Hurme e Kalimo 1992; Brotchie *et al.* 1995; Mozdziak *et al.* 2000) utilizaram este marcador para identificar células mitoticamente activas entre as quais as células satélite. A BrdU é um análogo da timidina que após ser metabolizado origina BrdU-trifosfato (BrdUTP). A BrdUTP pode ser incorporado no DNA em vez da timidina trifosfato, identificando, assim, as células que se encontram na fase S do ciclo celular (Mozdziak *et al.* 2000). As células sintetizando DNA incorporam BrdU, a qual pode ser identificada por imunohistoquímica, recorrendo ao anticorpo anti-BrdU (Hurme e Kalimo 1992). Assim, a BrdU pode ser utilizada para diferenciar células que se mantiveram sempre no estado quiescentes de células em divisão (Mozdziak *et al.* 2000; Smith *et al.* 2001). **Na imunohistoquímica, a quantidade de BrdU referida na literatura para ser incorporada em células satélite mitoticamente activas varia entre 5 mg a 150 mg BrdU/Kg de peso de rato (Brotchie *et al.* 1995; Jacobs *et al.* 1996; Schultz 1996; Putman *et al.* 2000), não existindo uma dose óptima deste composto de forma a obter a melhor marcação.**

No entanto, de forma a permitir a incorporação da BrdU nas células em proliferação, os animais têm de ser previamente injectados com este composto. Adicionalmente, a utilização da BrdU como marcador de células em proliferação requer uma desnaturação prévia do DNA, de forma a permitir a ligação do anticorpo primário ao BrdU. Esta etapa é crítica no desenrolar da técnica, uma vez que se o DNA não estiver em *single strand*, a BrdU não fica acessível para se ligar ao anticorpo.

A administração de BrdU associada à imunohistoquímica tem sido utilizada *in vivo* para estudar a contribuição das células satélite no processo regenerativo, após diferentes tipos de estímulos tais como, a sobrecarga de um músculo por extracção de um músculo sinergista (Carson e Alway 1996), o exercício físico (Smith *et al.* 2001), a suspensão dos membros traseiros (Schultz *et al.* 1994; Mozdziak *et al.* 2001), o hipotiroidismo (Jacobs *et al.* 1996) e a injeção de toxinas (McLoon *et al.* 1998). De igual forma, estudos *in vitro* que utilizam culturas de células satélite, recorrem preferencialmente ao BrdU com o intuito de marcar a actividade proliferativa deste tipo de células (Pavlath *et al.* 1998; Chakravarthy *et al.* 2000; Tatsumi *et al.* 2002; Machida *et al.* 2003).

No entanto, importa referir que embora a imunohistoquímica seja das metodologias mais utilizadas na identificação de células em proliferação, nomeadamente de CS, apresenta algumas limitações inerentes às técnicas de microscopia, nomeadamente o excessivo tempo requerido para o processamento das amostras e o facto de, para se ter uma ideia rigorosa, pormenorizada, requerer, por exemplo, a análise de cerca de 2500 cortes para permitir o estudo da globalidade de músculos da dimensão do *gastrocnemius* (uma vez que, por exemplo no ratinho, o músculo *gastrocnemius* tem cerca de 1 cm de comprimento e a espessura habitual dos cortes para microscopia óptica é de 4 µm).

Recentemente, alguns estudos utilizaram uma nova metodologia para semi-quantificar células em proliferação em organismos multicelulares (*Schistosoma mansoni*) (Knobloch *et al.* 2002) e no tecido cerebral (Moore *et al.* 2002). Esta técnica, designada de *South Western assay*, consiste numa extracção prévia de DNA, na sua transferência para uma membrana de nitrocelulose por *slot-blot* e na posterior marcação com anticorpos. O termo *South Western* aplicado a esta metodologia deve-se ao facto de a amostra ser DNA (Southern) e o tratamento efectuado ser o que se aplica habitualmente a proteínas (Western), quer ao nível da membrana, quer na utilização de anticorpos. O composto utilizado na marcação das células em proliferação é a BrdU e a forma de o visualizar implica, igualmente, a utilização do anticorpo primário anti-BrdU. Tal como sucede na imunohistoquímica, a ligação do anti-BrdU ao antigénio requer uma desnaturação prévia das amostras de DNA.

Esta metodologia foi aplicada por Knobloch *et al.* (2002) em culturas de *Schistosoma mansoni* incorporadas com uma solução de BrdU, com o intuito de comparar a actividade mitótica de machos e fêmeas. Moore *et al.* (2002) utilizaram o mesmo método para estudar os processos regenerativos no cérebro de ratos sujeitos a isquemia/reperfusão. Contudo, do nosso conhecimento, no tecido muscular esquelético, esta técnica nunca foi

aplicada, embora a quantificação de células em proliferação tais como as CS activas seja de importância primordial na compreensão do processo regenerativo. A técnica de *South Western* tem a vantagem de permitir a quantificação de células mitoticamente activas na globalidade do tecido, em vez de as visualizar em secções de tecido como sucede na imunohistoquímica.

Com base nos pressupostos teóricos anteriormente apresentados, este trabalho experimental tem como objectivo geral desenvolver metodologias que permitam a identificação e a quantificação de células satélite e de outras células em proliferação no tecido muscular esquelético. O estímulo utilizado para induzir a proliferação de CS foi o exercício físico, com predominância de contracções excêntricas. De facto, existe um grande consenso na literatura de que o exercício físico, com grande contribuição de contracções musculares excêntricas, induz lesão muscular e aumento da proliferação das células satélite, quer nos músculos de contracção rápida, quer nos músculos de contracção lenta (Darr e Schultz 1987; Smith *et al.* 2001).

De forma a satisfazer o objectivo geral proposto, foram delineados três objectivos específicos:

- a) adaptar a metodologia do *South Western* ao músculo esquelético recorrendo a doses variadas de BrdU e a diferentes quantidades de DNA aplicada na membrana de nitrocelulose;
- b) verificar de forma qualitativa e quantitativa, qual o tipo de células que se encontram mitoticamente activas na presença e na ausência de um estímulo lesivo;
- c) utilizar a imunohistoquímica como método critério e comparar os resultados obtidos pelas duas metodologias.

2. 2. Material e Métodos

A - Protocolo experimental

A amostra em estudo foi constituída por 50 ratinhos macho Charles River CD1, de 8 semanas de idade e com um peso médio entre 35 e 40 gramas. Os animais foram colocados em gaiolas individuais num ambiente de temperatura constante de 20°C e submetidos a um ciclo invertido de luz/escuro de 12/12h.

Após uma semana de aclimatização, os animais foram divididos aleatoriamente num grupo experimental submetido a exercício físico (n=25) e num grupo não submetido a exercício físico (n=25).

Quarenta e oito horas antes do sacrifício, os animais foram injectados intraperitonealmente (i.p.) com uma solução de soro fisiológico com diferentes concentrações de BrdU (B-9285, Sigma): 0, 5, 10, 20 e 50 mg de BrdU/Kg de peso de rato (n=5, para cada subgrupo). Imediatamente após a injeção de soro ou de BrdU os ratinhos pertencentes ao grupo experimental foram sujeitos a um protocolo de exercício físico que consistiu na realização de 60 minutos de corrida em tapete rolante a 70% da velocidade máxima e com uma inclinação negativa de 20%. O protocolo de exercício decorreu durante o período diurno e foi iniciado sempre à mesma hora.

Todos os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, sendo-lhes retirado os músculos *gastrocnemius*, para análise bioquímica e para análise morfológica.

Todos os procedimentos seguiram as especificações e as recomendações do *National Institute of Health (NIH) Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

A.1. - Avaliação de células mitoticamente activas por *South Western*

Extracção de DNA

Os músculos *gastrocnemius* foram cortados em pequenos pedaços e transferidos cuidadosamente para um tubo de ensaio contendo 500 µl de tampão de extracção, (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8), 50 µl de SDS 10% e 10 µl de proteinase K 10 mg/ml, sendo posteriormente incubados num banho a 55°C, durante aproximadamente 24 horas.

Após o período de incubação, juntou-se 125 µl de NaCl 6M e aqueceu-se novamente durante 10 minutos a 55°C. De seguida, as amostras foram tratadas com um volume

(≈700 µl) de clorofórmio e agitadas suavemente num agitador orbital durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os homogeneizados foram centrifugados durante 10 minutos, a 2000 rpm, e ao sobrenadante resultante adicionou-se um volume de isopropanol com o intuito de precipitar o DNA. O RNA foi removido através de incubação com RNase A (com uma concentração final de 1mg/ml) durante 20 minutos a 37°C, de forma a evitar a reactividade do anticorpo anti-BrdU à uridina endógena (Haider *et al.* 1997). A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria (Spectronic Genesys 5) no comprimento de onda de 260nm. Com o intuito de verificar a pureza do DNA determinou-se a densidade óptica (DO) a 280nm e calculou-se a razão DO280nm/DO260nm (Sambrook *et al.* 1989).

Avaliação das células em proliferação por *South Western*

A semi-quantificação das células mitoticamente activas foi efectuada utilizando um anticorpo anti-BrdU, de acordo com a metodologia desenvolvida por Knobloch *et al.* (2002), com algumas adaptações.

De forma a permitir a ligação do anticorpo anti-BrdU ao BrdU, desnaturou-se o DNA através da incubação das amostras a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente o DNA foi transferido por *slot-blot* para uma membrana de nitrocelulose (Hybond, ECL, Amersham Pharmacia Biotech), previamente hidratada. Com o intuito de fixar os ácidos nucleicos à membrana, esta foi incubada numa estufa a 80°C durante 2 horas (Moore *et al.* 2002).

A fim de detectar o BrdU incorporado no DNA foi utilizado um método modificado de Haider *et al.* (1997). Procedeu-se à lavagem da membrana de nitrocelulose de forma cuidadosa com TBS (100 mM em Tris – HCl pH 8, 1,5mM de NaCl) durante 3-5 minutos, seguindo-se o seu bloqueamento com uma solução de leite em pó a 5% [5g de leite magro em pó em 100 ml de solução TBS-T (TBS e 0,05% de Tween 20)] durante 5h à temperatura ambiente com agitação. Posteriormente, procedeu-se à incubação com o anticorpo monoclonal anti-BrdU (B-2531, Sigma) diluído 1:1000 na solução (5% de leite magro em pó em TBS-T) durante a noite a 4°C (Knobloch *et al.* 2002). Com o intuito de remover o excesso de anticorpo foram efectuadas 3 lavagens com a solução de TBS-T durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Seguidamente, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (*rabbit peroxidase conjugated anti-mouse IgG*) (A -9044, Sigma), diluído 1:500 em leite magro em pó, durante 2 horas com agitação à temperatura ambiente. De forma idêntica, retirou-se o

excesso do anticorpo secundário com lavagens com TBS-T. Por fim efectuou-se a detecção do DNA marcado, por quimioluminescência, utilizando os reagentes de ECL (RPN2108, Amersham Bioscience) (Moore *et al.* 2002). O sinal da membrana foi transferido para um filme, por exposição com a mesma, numa cassete apropriada, durante 10 minutos.

O filme foi revelado da seguinte forma: 2 minutos no revelador (Z354090, Sigma), lavagem em água corrente, 2 minutos no fixador (Z354104, Sigma) e nova lavagem em água corrente. O filme foi finalmente analisado utilizando o software QuantityOne da BioRad (versão 4.3.1.). Desta forma, o sinal das bandas foi avaliado em termos de densidade óptica (DO).

Todos os valores de densidade óptica obtidos para cada um dos grupos foram previamente subtraídos do valor de densidade óptica do controlo, colocado na mesma membrana. O controlo correspondeu a 0 mg de BrdU ou seja a ratinhos que foram injectados apenas com soro fisiológico.

A. 2. - Avaliação de células mitoticamente activas por imunohistoquímica

De cada animal foi retirado um fragmento do músculo *gastrocnemius* para análise morfológica por imunohistoquímica. Os músculos foram fixados durante 2 horas por imersão numa solução contendo 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose diluída em tampão fosfato (pH=7,2). Seguidamente efectuaram-se lavagens com soluções de cacodilato de sódio a 0,1M e 0,2M, com o intuito de remover o excesso do fixador. A desidratação dos tecidos foi efectuada com a utilização de soluções de álcool etílico em concentração crescente. Por fim procedeu-se à impregnação dos músculos com a resina *LRwhite medium grade* (L033, TAAB). A polimerização da resina, em cápsulas de gelatina, foi efectuada numa estufa, a 50°C, durante 24 horas. Os blocos de tecido foram cortados num ultramicrotomo (Ultracut, Pabisch), tendo os cortes a espessura de 4 µm.

Após colagem dos cortes histológicos em lâminas silanizadas (S-4651, Sigma) por aquecimento, estas foram colocadas à temperatura ambiente. Posteriormente efectuou-se o bloqueamento das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio a 3% em PBS e metanol, durante 5 minutos. Procedeu-se a três lavagens das lâminas com uma solução de PBS (137mM NaCl, 1,5mM KH₂PO₄, 6,5mM Na₂HPO₄) com a finalidade de

remover o excesso da solução de peróxido de hidrogénio. Seguidamente, aplicou-se nos cortes uma solução de tripsina 0,1% diluída em 0,1% CaCl₂, durante 30 minutos a 37°C, para permitir a exposição dos epitopos. Posteriormente, procedeu-se à desnaturação do DNA, colocando as lâminas numa solução de HCl 2M a 56°C durante meia hora. A neutralização do ácido foi efectuada através de 2 lavagens das lâminas com uma solução de borato de sódio 0,1M, seguida de uma lavagem com PBS. Posteriormente à desnaturação do DNA, realizou-se o bloqueamento dos locais de ligação não específica com soro de coelho (R-9133, Sigma) diluído 1:30 em PBS por um período de uma hora. Seguiu-se a aplicação do anticorpo monoclonal anti-BrdU (B-2531, Sigma) diluído 1:10 numa solução de PBS contendo 0,2% de BSA e 0,005% de Tween 20, durante 2 horas com agitação. O excesso de anticorpo foi removido através de lavagem 3 vezes com uma solução de PBS. Seguidamente as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário *rabbit peroxidase-conjugated anti-mouse* (A-9044, Sigma) diluído 1:20 em PBS durante 2 horas com agitação. De forma idêntica foram efectuadas 3 lavagens com PBS com o intuito de remover o excesso de anticorpo. De forma a aumentar a marcação das células em proliferação procedeu-se à incubação durante a noite a 4°C com o complexo PAP (*peroxidase anti-peroxidase*) (P-2416, Sigma) diluído 1:10 em PBS. Após o período de incubação procedeu-se à lavagem das lâminas com PBS e com uma solução de Tris 0,1M (pH=7,6) durante 10 minutos cada. A visualização dos locais marcados foi efectuada através da incubação das lâminas numa solução de DAB (diaminobenzidina)/H₂O₂ durante 20 minutos. Por fim as lâminas foram lavadas com água destilada e não sofreram qualquer coloração ou tratamento adicional. Para cada músculo foram efectuadas lâminas para controlo negativo, sem a adição do anticorpo primário. Os controlos positivos foram efectuados com testículo do mesmo animal. As lâminas, após montagem, foram visualizadas num fotomicroscópio (Zeiss Phomi 3), tendo sido observadas um mínimo de 100 fibras em cada músculo em cortes transversais (Soares e Duarte 1991). Foi contabilizado o total de núcleos marcados, de cor castanha, pelo DAB, e discriminada a sua origem intersticial (endotelial e não endotelial), ou das próprias fibras (à periferia e em posição central).

Análise estatística

A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis em cada um dos grupos. Nas determinações bioquímicas e morfológicas foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar a normalidade da distribuição. Nas determinações bioquímicas, a análise de variância (One-way ANOVA) com o teste de *Bonferroni post-*

hoc foram utilizados para comparar as diferenças de densidade óptica entre quantidades distintas de DNA aplicadas na membrana para a mesma dose de BrdU. Nas análises morfológicas, o *t*-teste Student para amostras independentes foi utilizado para comparar as diferenças entre o grupo exercitado e o grupo não exercitado. Os dados de imunohistoquímica foram correlacionados com os dados bioquímicos. As correlações foram efectuadas através do coeficiente de correlação de *Pearson*. O cálculo dos dados foi efectuado pelo *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

2.3. Resultados

Numa primeira fase serão apresentados os resultados referentes à metodologia do Southern-western, seguidos em sequência pela apresentação dos resultados referentes à técnica de imunohistoquímica.

A. 1. Resultados referentes à metodologia de *South Western*

Como se pode verificar pela análise da tabela 1, referente ao grupo não exercitado, e pela observação da tabela 2, alusiva ao grupo submetido a exercício físico, os resultados mostraram que para todas as doses de BrdU utilizadas, a densidade óptica aumentou em função da quantidade de DNA aplicada na membrana de nitrocelulose. É também visível no grupo não submetido a exercício físico (tabela1), que para quantidades baixas (0,2; 0,5 e 1 µg) de DNA aplicadas na membrana e para diferentes doses de BrdU injectadas nos animais, os valores de densidade óptica (DO) foram muito semelhantes. No mesmo grupo, constatou-se ainda, que para quantidades mais elevadas de DNA (2 e 5 µg) e doses distintas de BrdU, os valores de densidade óptica (DO) não se apresentaram tão uniformes. No que diz respeito ao grupo submetido a exercício físico, foi possível observar que para cada uma das quantidades de DNA aplicada na membrana e para diferentes doses de BrdU, os valores de DO foram bastante semelhantes (tabela 2 e gráfico 1B).

Tabela 1 - valores médios ± desvio padrão (DP) de densidade óptica do grupo não exercitado, para cada uma das quantidades de DNA aplicadas na membrana de nitrocelulose, em ratinhos que foram previamente injectados com 5, 10, 20 e 50 mg de bromodeoxiuridina (BrdU)/Kg de peso de rato.

Densidade óptica				
	5mg BrdU	10 mg BrdU	20 mg BrdU	50mg BrdU
µg de DNA	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
0,2	0,020±0,025*	0,035±0,023*	0,050±0,032*	0,041±0,027*
0,5	0,151±0,050**	0,184±0,059**	0,132±0,036**	0,149±0,035 [†]
1	0,400±0,095 ^{††}	0,443±0,099 ^{††}	0,477±0,110 ^{††}	0,503±0,157 ^{††}
2	1,090±0,224 [‡]	1,101±0,253 [‡]	1,361±0,153 [‡]	1,269±0,222 [‡]
5	1,901±0,202	1,631±0,302	1,899±0,269	1,953±0,271

*p<0,05 0,2 µg vs 1, 2, 5 µg **p<0,05 0,5 µg vs 2,5 µg [†]p<0,05 0,5 µg vs 1, 2, 5 µg ^{††}p<0,05 1 µg vs 2,5 µg [‡]p<0,05 2 µg vs 5 µg

Tabela 2 - valores médios \pm desvio padrão (DP) de densidade óptica do grupo submetido a exercício físico, para cada uma das quantidades de DNA aplicadas na membrana de nitrocelulose, em ratinhos que foram previamente injectados com 5, 10, 20 e 50 mg de bromodeoxiuridina (BrdU)//Kg de peso de rato.

Densidade óptica				
	5mg BrdU	10 mg BrdU	20 mg BrdU	50mg BrdU
μg de DNA	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
0,2	0,220 \pm 0,008*	0,291 \pm 0,001*	0,186 \pm 0,001*	0,173 \pm 0,002*
0,5	0,556 \pm 0,130**	0,614 \pm 0,131**	0,553 \pm 0,153**	0,519 \pm 0,133**
1	1,067 \pm 0,198 [†]	1,194 \pm 0,178 [†]	1,214 \pm 0,294 [†]	1,143 \pm 0,248 [†]
2	1,627 \pm 0,389	1,562 \pm 0,229	1,798 \pm 0,367	1,698 \pm 0,321
5	2,254 \pm 0,350	2,127 \pm 0,442	2,222 \pm 0,289	2,303 \pm 0,329

*p<0,05 0,2 μg vs 1, 2, 5 μg **p<0,05 0,5 μg vs 1,2,5 μg [†]p<0,05 1 μg vs 5 μg

Pela análise da figura 1, foi possível observar que para todas as doses de BrdU injectadas nos animais, a técnica apresentou pouca sensibilidade para a quantidade de 0,2 μg de DNA aplicada na membrana, particularmente no grupo não submetido a exercício físico (figura 1A). Verificou-se ainda que o traçado das curvas tendeu a sofrer um achatamento para quantidades de DNA superiores a 2 μg , sugerindo existir uma saturação de sinal para quantidades de DNA iguais ou superiores a 2 μg .

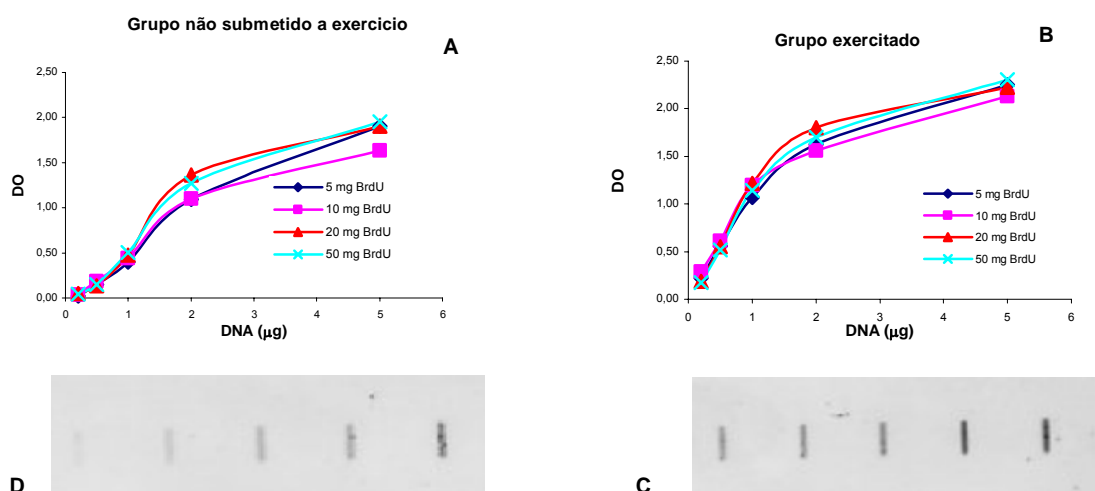


Figura 1 A,B) Valores médios da densidade óptica (DO) em função da quantidade de DNA para diferentes doses de BrdU do grupo não submetido a exercício (A) e do grupo exercitado (B) C,D) Filmes representativos do *slot-blot* referente à dose de 50 mg de BrdU para as diferentes quantidades de DNA aplicadas (0,2; 0,5 ;1; 2 e 5 μg) do grupo não submetido a exercício (C) e do grupo exercitado (D).

Com o intuito de verificar qual a dose mais indicada de BrdU a injectar nos animais, foram efectuadas curvas logarítmicas de DO em função da quantidade de DNA aplicada na membrana, tendo sido calculado o seu coeficiente de correlação.

No grupo não submetido a exercício físico, foram obtidos os coeficientes de correlação de *Pearson* de 0,8803, 0,8877, 0,8871, e 0,8880 ($p < 0,05$) para as curvas referentes às doses de 5, 10, 20 e 50 mg de BrdU, respectivamente. No que diz respeito ao grupo exercitado, os coeficientes de correlação calculados foram de 0,8986, 0,9637, 0,9465 e 0,9895 ($p < 0,05$) para as doses de 5, 10, 20 e 50 mg de BrdU, respectivamente (figura 2).

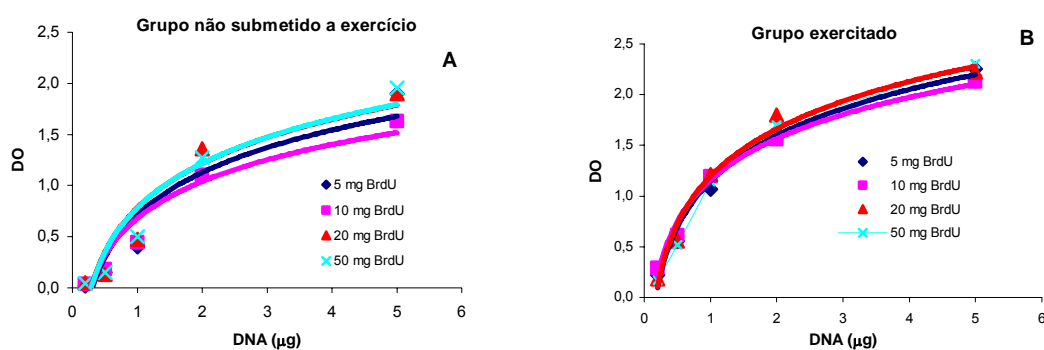


Figura 2 A,B) Curvas logarítmicas para os valores médios da densidade óptica (DO) versus quantidade de DNA, referentes às diferentes doses de BrdU aplicadas na membrana para o grupo não submetido a exercício físico (A) e para o grupo exercitado (B)

Como seria de esperar, o grupo exercitado apresentou valores de DO superiores aos do grupo não submetido a exercício físico, para a totalidade das doses de BrdU injectadas e para todas as quantidades de DNA aplicadas na membrana.

Pode-se ainda verificar, através da análise da figura 3, que para todas as doses de BrdU injectadas nos animais, ocorreu um aumento estatisticamente significativo da DO no grupo submetido a exercício físico comparativamente ao grupo não exercitado apenas para a quantidade de 1 µg de DNA.

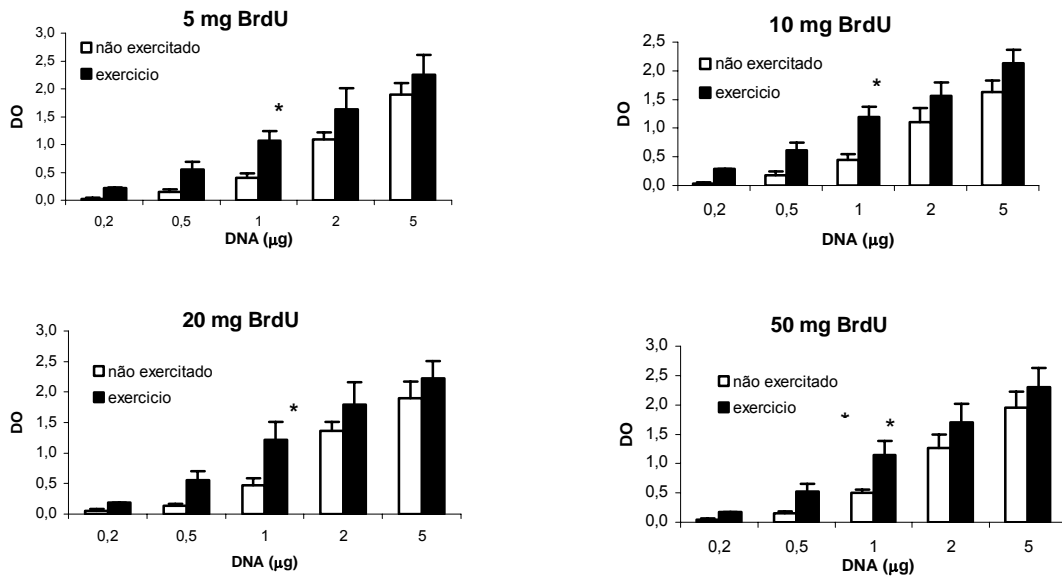


Figura 3 Comparação dos valores médios e respectivos desvios padrão das densidades ópticas (DO) do grupo não exercitado com o grupo exercitado para as diferentes quantidades de DNA aplicadas na membrana e para as diferentes doses de bromodeoxiuridina (BrdU).

* $p < 0,05$ exercício vs não exercitado

A.2. Resultados referentes à imunohistoquímica

Tal como seria de esperar, os controlos negativos não evidenciaram núcleos marcados (figura 4). Pelo contrário, os túbulos seminíferos (controlo positivo) apresentaram espermatozonias e espermatozócitos com núcleos bem marcados (figura 5).

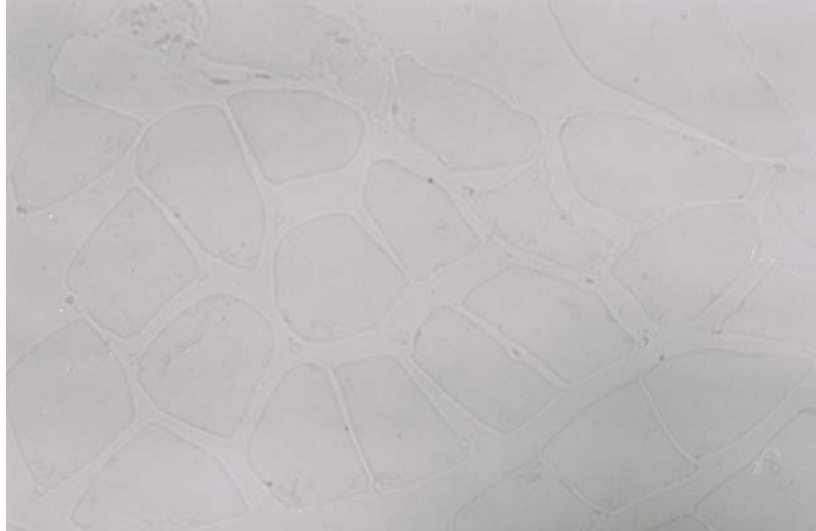


Figura 4 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal não exercitado injectado com 10 mg de BrdU e não sujeito a anticorpo primário (controlo negativo), onde são observadas fibras musculares sem marcação de mionúcleos ou de núcleos intersticiais (ampliação original 625x).

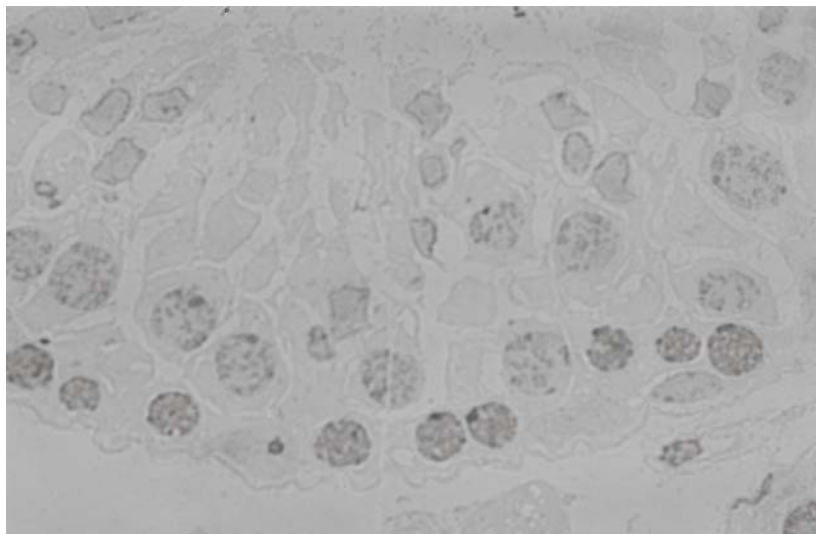


Figura 5 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do túbulo seminífero de um animal do grupo não exercitado, injectado com 5 mg de BrdU. É visível a incorporação de BrdU nos núcleos das espermatogonias e espermatócitos I e II assim como em algumas espermatides (ampliação original 2500x).

Conforme se pode observar nas figuras 6 e 7, a incorporação de BrdU não se restringiu somente a células satélite mas também a células intersticiais, de origem endotelial e não endotelial. É de salientar que os núcleos localizados na periferia das fibras musculares

foram entendidos como núcleos de CS, uma vez que os mionúcleos das fibras maduras são pós-mitóticos e, como tal, não incorporam a BrdU.

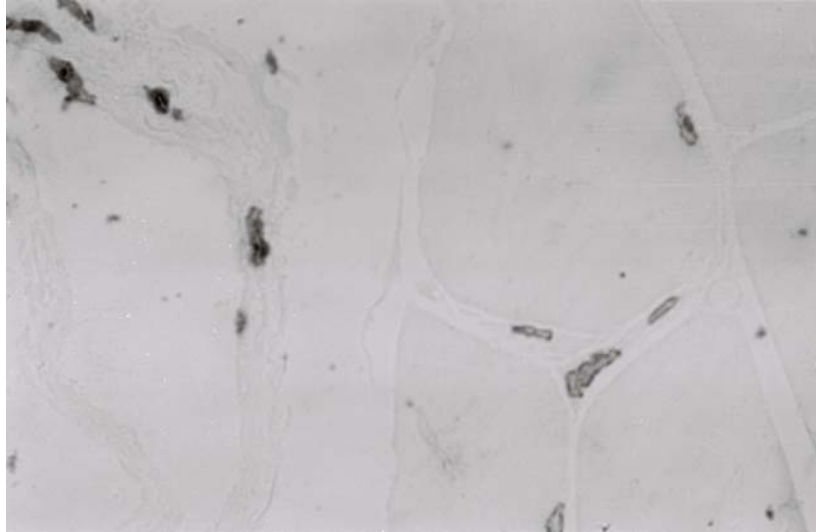


Figura 6 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius*, de um animal do grupo não exercitado, injectado com 50 mg de BrdU, onde são observados numerosos núcleos marcados no interstício, de origem endotelial e não endotelial, assim como núcleos marcados à periferia de duas fibras musculares, provavelmente núcleos de células satélite (ampliação original 2500x).



Figura 7 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo exercitado, injectado com 20 mg de BrdU, onde é evidente a grande quantidade de núcleos marcados quer no interstício quer na periferia das próprias fibras musculares (ampliação original 625x).

Na tabela 3 está descrita a percentagem de contribuição dos núcleos das células endoteliais, das células intersticiais, das células satélite e dos núcleos em posição central para a totalidade dos núcleos que incorporam BrdU. Como se pode verificar, no grupo não exercitado a grande maioria dos núcleos marcados corresponde a células endoteliais. Pelo contrário, no grupo submetido a exercício físico, comparativamente ao grupo não exercitado, ocorreu um aumento acentuado de núcleos marcados correspondendo, quer a células intersticiais não endoteliais, quer a células satélite, e um incremento ligeiro de núcleos marcados em posição central. Pode-se ainda constatar que no grupo exercitado, embora a percentagem de células endoteliais marcadas seja elevada, ocorreu um decréscimo significativo comparativamente ao grupo não exercitado.

Tabela 3 - valores médios e respectivos desvios padrão (DP) da percentagem de núcleos com origem endotelial, intersticial não endotelial, nas células satélite e em posição central nas fibras musculares, relativamente ao total de núcleos que incorporaram bromodeoxiuridina (BrdU), nos grupos não exercitado e exercitado, em ratinhos previamente injectados com 50 mg de BrdU/Kg de peso de rato.

Grupos	% de núcleos marcados			
	Células Endoteliais	Células Intersticiais	Células Satélite	Núcleos Centrais
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
não exercitado	76,5±6,26	8,8±1,53	8,8±2,62	5,9±3,12
exercitado	42,8±5,13 *	23,3±4,99 *	22,3±2,87 *	11,6±2,57 *

* p<0,05 exercitado vs não exercitado

Para cada uma das quantidades de DNA aplicadas na membrana foi efectuada uma correlação entre o número de núcleos totais marcados por imunohistoquímica e os respectivos valores de densidade óptica obtidos por *South Western*, para a dose de 50 mg BrdU. Assim, para as quantidades de DNA de 0,2, 0,5, 1, 2 e 5 µg, foram encontrados os seguintes valores de correlação, 0.752, 0.905, 0.918, 0.802, 0.708 (p<0,05), respectivamente.

2.4. Discussão

Dada a importância das células precursoras miogénicas no decurso do desenvolvimento e da regeneração muscular, várias metodologias têm sido desenvolvidas com o intuito de identificar este tipo celular (para refs ver Lawson-Smith e McGeachie 1998). No entanto, de acordo com a literatura, a técnica de imunohistoquímica com recurso à utilização da BrdU tem sido, notoriamente, a mais utilizada (Hurme e Kalimo 1992; Schultz *et al.* 1994; Wehrle *et al.* 1994; Brotchie *et al.* 1995; Carson e Alway 1996; Dupont-Versteegden *et al.* 1999; Schmalbruch e Lewis 2000; Smith *et al.* 2001) e, por esta razão, foi por nós escolhida como técnica critério, tendo os seus resultados sido usados como padrão de comparação. Sendo esta técnica morosa, nomeadamente no que diz respeito ao processamento das amostras, requerendo a elaboração de muitos cortes para se ter uma noção abrangente e representativa da totalidade do tecido, neste trabalho experimental utilizamos uma metodologia mais célere, que nos permitisse analisar o comportamento das células precursoras miogénicas na globalidade do tecido muscular, i.e. a técnica de *South Western*. Esta técnica foi recentemente aplicada para semi-quantificar células em proliferação quer em organismos multicelulares (Knobloch *et al.* 2002) quer no tecido cerebral (Moore *et al.* 2002). No entanto, do nosso conhecimento, não foi ainda utilizada no tecido muscular esquelético e por isso, foi necessário testar as condições mais adequadas para marcar células em proliferação, nomeadamente no que diz respeito à quantidade de DNA aplicada na membrana de nitrocelulose e à dose de BrdU injectada nos animais.

Nos trabalhos experimentais anteriormente referidos (Knobloch *et al.* 2002; Moore *et al.* 2002) que recorreram a esta técnica para marcar células em proliferação, as quantidades de DNA aplicadas na membrana foram de 0,5µg e de 20 µg respectivamente, ou seja muito distintas entre si; no entanto, verificámos no presente estudo que, no caso do músculo esquelético, as quantidades mais adequadas a aplicar na membrana se situam entre 0,2 e 5 µg de DNA.

Pela análise dos diversos trabalhos experimentais que recorreram à imunohistoquímica e que utilizaram como marcador de células em proliferação a BrdU, previamente injectada i.p, verificámos que o espectro de doses de BrdU utilizado variava entre 5 e 150 mg/kg de peso de rato (McCormick e Thomas 1992; Schultz *et al.* 1994; Jacobs *et al.* 1996; Schultz 1996; McLoon *et al.* 1998; Smith *et al.* 2001; Fernandez *et al.* 2002; Tamaki *et al.* 2002).

Adicionalmente, verificámos que no trabalho desenvolvido por Moore *et al.* (2002) com recurso à técnica de *South Western* foi administrada a quantidade de 10 mg de BrdU/Kg de peso de rato para distinguir células mitoticamente activas em cérebro de ratos sujeitos a isquemia/reperfusão. Desta forma, optámos por injectar os animais com doses de BrdU ligeiramente superiores e inferiores a 10 mg de BrdU/Kg, i.e., entre 5mg e 50mg de BrdU/kg de peso de animal.

A análise global dos resultados obtidos no presente estudo demonstrou que relativamente à quantidade de DNA aplicada na membrana, a densidade óptica relacionou-se de forma directa com o incremento da quantidade de DNA, para todas as doses de BrdU injectadas nos animais, quer no grupo não submetido a exercício físico, quer no grupo exercitado. Uma vez que a BrdU pode ser incorporada no DNA por substituição da timidina trifosfato, identificando assim as células durante a fase S do ciclo celular (Mozdziak *et al.* 2000), o aumento da quantidade de amostra de DNA aplicada resulta, como seria de esperar, numa ampliação do sinal obtido. Contudo, pela análise do traçado das curvas apresentadas na figura 1A, para as várias doses de BrdU injectadas, verificámos que este aumento da densidade óptica não é linear. De facto, pudemos constatar que para quantidades baixas de DNA aplicado na membrana, tais como 0,2 µg, esta metodologia mostrou-se pouco sensível, particularmente no grupo não submetido a exercício físico, e que para quantidades superiores a 2 µg tendia a ocorrer saturação de sinal levando a um achatamento do traçado das curvas. Assim, pelos resultados obtidos no nosso estudo, é possível verificar que as quantidades mais adequadas de DNA a aplicar na membrana, se devem situar entre 0,5 e 2 µg.

Com o objectivo de analisar qual a dose de BrdU mais indicada para injectar nos animais, foram construídas curvas logarítmicas de quantidade de DNA em função da densidade óptica, para as várias doses injectadas deste composto, e procedeu-se ao cálculo dos respectivos coeficientes de correlação. Pela análise, quer do traçado das curvas (figura 2), quer dos respectivos coeficientes de correlação, pudemos constatar que as diferentes doses de BrdU injectadas nos animais parecem ter efeitos análogos na marcação de células mitoticamente activas. Os resultados obtidos no nosso estudo vão de encontro a outros referidos na literatura, uma vez que, como já foi referido anteriormente, nos diversos trabalhos experimentais que recorreram à imunohistoquímica com o intuito de marcar células em proliferação através da BrdU (Carson e Alway 1996; Phelan e Gonyea 1997; Mozdziak *et al.* 2001; Alway *et al.* 2003), foram usadas doses distintas deste

composto com o mesmo objectivo. Neste caso, e uma vez que temos de escolher uma das doses de BrdU para injectar nos animais nos estudos seguintes, optámos pela mais elevada, ou seja, por 50mg de BrdU/Kg de rato. De acordo com a bibliografia consultada, esta dose de BrdU é das mais utilizadas (McLoon *et al.* 1998; Himms-Hagen *et al.* 2000; Smith *et al.* 2001; Fernandez *et al.* 2002; McLoon *et al.* 2004) e, adicionalmente, fornece-nos mais garantias na marcação de um maior número de células em proliferação.

Importa, no entanto, salientar que embora vários dos trabalhos experimentais efectuados utilizem a imunohistoquímica com incorporação de BrdU com a finalidade de marcar células *stem*, este composto não marca exclusivamente este tipo de células, mas também fibroblastos, células endoteliais e algumas células inflamatórias, (Lawson-Smith e McGeachie 1998), ou seja todas as células que estejam em proliferação, mas também as suas descendentes. Efectivamente, os dados por nós obtidos e referentes à imunohistoquímica, mostram claramente que a incorporação da BrdU não é exclusiva de células *stem*, e como tal, não deverá ser utilizada como marcador específico deste tipo de células, mas sim como um marcador geral de proliferação celular. Na análise qualitativa obtida por imunohistoquímica, é evidente a incorporação de BrdU por núcleos de vários tipos celulares. No grupo não submetido a exercício físico, e como se pode observar na figura 6, foi notória a marcação de células sobretudo no espaço intersticial, de origem endotelial e não endotelial, embora se tenha verificado também, alguma marcação de células satélite. De forma idêntica, com a metodologia de *South Western*, o grupo não exercitado apresentou marcação devido à incorporação de BrdU, e o sinal obtido aumentou com a quantidade de DNA aplicada na membrana de nitrocelulose. No caso de a BrdU ser incorporada apenas por células satélite, o sinal de densidade óptica obtido no grupo não exercitado deveria ser muito baixo, o que não sucedeu, sobretudo para as quantidades mais elevadas de DNA aplicadas.

Assim sendo, a marcação de células em proliferação observada nos músculos dos animais pertencentes ao grupo não exercitado, parece resultar sobretudo da presença de células intersticiais de origem endotelial, como se pode verificar da análise quantitativa obtida por imunohistoquímica (tabela 3)

No que diz respeito ao grupo submetido a exercício físico, os resultados do nosso estudo, referentes à imunohistoquímica, mostraram uma acentuada marcação de células em proliferação, como é evidenciada pela análise da figura 7. A análise quantitativa obtida por esta técnica (tabela 3), revelou ainda que no grupo exercitado, por comparação com o grupo não submetido a exercício físico, ocorreu um aumento acentuado na marcação

de núcleos de células satélite e de células intersticiais de origem não endotelial, um incremento de núcleos marcados em posição central e um decréscimo de células endoteliais que incorporaram a BrdU. Através da metodologia de *South Western*, também verificámos que a magnitude do sinal obtido no grupo exercitado aumentou em todo o espectro de DNA aplicado na membrana, comparativamente ao grupo não exercitado. Neste grupo experimental, os animais foram submetidos a um protocolo de exercício físico com grande contribuição de contracções excêntricas, o qual produz lesão localizada das miofibras a vários níveis (Darr e Schultz 1987; Appell *et al.* 1992; Smith *et al.* 2001; Armand *et al.* 2003). Assim sendo, a lesão induzida neste grupo experimental terá conduzido à libertação de factores de crescimento, ou de outros mediadores locais, pela fibra danificada, os quais são responsáveis pela migração e activação inicial das CS (Bischoff 1997; Villena e Brandan 2004). Também a indução da resposta inflamatória, motivada pelo exercício excêntrico, poderá resultar na libertação adicional de factores de crescimento e de citocinas, contribuindo, de igual forma, para a activação, deste tipo de células precursoras miogénicas e de outros tipos celulares (Chambers e McDermott 1996; Husmann *et al.* 1996; Carlson 2001; Hawke e Garry 2001). Desta forma, verificámos que no grupo exercitado, comparativamente ao grupo não submetido a exercício físico, ocorreu um aumento de densidade óptica para todas as quantidades de DNA utilizadas (figura 3). Uma vez que na metodologia de *South Western*, o sinal obtido fornece-nos informação do número total de células marcadas, recorreremos à imunohistoquímica para verificar qual o tipo de células que incorporaram a BrdU. Assim, pela análise quantitativa efectuada através da contagem discriminada de núcleos que incorporaram BrdU, verificámos que os animais submetidos a exercício físico, em comparação com os não exercitados, apresentavam não só um maior número de núcleos marcados referentes a CS, mas também a células presentes no espaço intersticial de origem sobretudo não endotelial, provavelmente fibroblastos. A libertação de factores de crescimento e de outros mediadores, quer pelas fibras lesadas, quer pelas células inflamatórias, poderá assim, explicar o aumento da actividade proliferativa dos tipos celulares anteriormente referidos.

Desta forma, pela análise qualitativa mas sobretudo quantitativa dos resultados obtidos por imunohistoquímica, esperaríamos que as diferenças de densidade óptica, obtidas por *South Western*, entre o grupo exercitado e o grupo não submetido a exercício físico, fossem superiores. Contudo, pela análise dos resultados (figura 3), pudemos constatar que para todas as doses de BrdU injectadas nos animais, apenas para a quantidade de 1

μg de DNA aplicada na membrana o aumento é acentuado e estatisticamente significativo comparativamente ao grupo não submetido a exercício físico. Adicionalmente, pudemos verificar que as diferenças de densidade óptica do grupo exercitado em relação ao grupo não submetido a exercício, para as quantidades de 2 μg e particularmente de 5 μg de DNA aplicado são pouco acentuadas. De facto, como já foi referido anteriormente, os sinais obtidos para estas duas quantidades de DNA aplicadas na membrana, sobretudo no grupo exercitado, apresentavam características de saturação e, como tal, as diferenças entre os dois grupos foram mais ténues. Desta forma, na metodologia de *South Western*, a quantidade de DNA aplicada na membrana deverá ser de 1 μg .

Com o intuito de verificar, se a técnica de *South Western* poderia constituir alternativa à imunohistoquímica na marcação de células em proliferação, foram efectuadas curvas de correlação para as diferentes quantidades de DNA aplicadas na membrana, entre a totalidade de núcleos marcados por imunohistoquímica e os valores de densidade óptica, obtidos pela técnica de *South Western*. Através do cálculo dos respectivos coeficientes de correlação, verificámos que, para todas as quantidades de DNA aplicadas na membrana, mas em particular para a quantidade de 1 μg , existe uma correlação elevada e significativa entre as duas metodologias.

Os resultados deste estudo mostram que a metodologia de *South Western* é uma técnica simples e eficaz na marcação de células em proliferação, nomeadamente de células satélite. Uma vez que os resultados da metodologia de *South Western* apresentaram uma boa correlação com os resultados obtidos com a imunohistoquímica parece-nos que esta técnica, por nós adaptada ao tecido muscular, poderá representar uma alternativa adequada na detecção de células mitoticamente activas.

III. Regeneração muscular esquelética

3.1. Revisão da literatura

3.1.1. Aspectos morfológicos e moleculares associados à regeneração muscular.

A noção de que o músculo esquelético apresentava uma baixa capacidade regenerativa persistiu por várias décadas na literatura. No entanto, com as demonstrações pioneiras de Studitsky (para refs ver Carlson 2003) de que um músculo esquelético podia regenerar sobre determinadas condições, e com a descoberta das células satélite, por Mauro em meados do século XX (Mauro 1961), o processo de regeneração muscular tornou-se um tema científico de relevo.

Actualmente, vários investigadores têm focado a sua atenção nos mecanismos que regulam o crescimento e a regeneração muscular esquelética. Estes temas são de grande interesse científico e clínico, uma vez que a manipulação terapêutica dos mecanismos subjacentes ao crescimento e à regeneração muscular pode melhorar a

qualidade de vida de indivíduos com patologias, tais como a distrofia muscular (Charge e Rudnicki 2004).

Em condições metabólicas basais, o músculo esquelético é um tecido com baixo *turnover* de núcleos. Pequenas agressões ocorrem no dia a dia, desencadeando apenas uma pequena renovação dos constituintes das fibras musculares (Charge e Rudnicki 2004). De facto, no músculo de rato adulto, somente cerca de 1-2% de mionúcleos são substituídos por semana (Schmalbruch e Lewis 2000). Contudo, o tecido muscular esquelético é frequentemente sujeito a vários tipos de agressões, desencadeando severas lesões neste tecido. Nestas circunstâncias, e embora o tecido muscular esquelético seja um tecido diferenciado, ele é capaz de uma rápida e completa regeneração (Chen e Goldhamer 2003). Essa capacidade regenerativa tem sido principalmente atribuída às células satélite (Goldring *et al.* 2002; Shefer *et al.* 2002; Chen e Goldhamer 2003; Partridge 2003).

A regeneração muscular esquelética é um processo complexo que requer a interacção coordenada de células precursoras miogénicas, factores de crescimento, componentes inflamatórios e de componentes vasculares (Goetsch *et al.* 2003). A regeneração muscular esquelética pode ser induzida *in vivo* após a aplicação de um agente agressor mecânico, químico ou térmico e a sequência de eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a regeneração tem sido bem caracterizada no músculo inteiro (Esser e White 1995). Em termos globais, após um estímulo nocivo, a fibra muscular lesada incorre, em primeiro lugar, numa fase de degeneração intrínseca, seguida de uma fase de degeneração extrínseca e, finalmente, numa fase de regeneração muscular (Carlson 2003).

A fase de degeneração intrínseca é frequentemente iniciada pela perda de funcionalidade do sarcolema e, conseqüente, pelo aumento da permeabilidade das fibras musculares (Carlson 2003). Nestas circunstâncias de perda de funcionalidade do sarcolema, o aumento de fluxo de cálcio para o interior da fibra resulta na perda da homeostasia a este íão e no aumento da actividade de diversas proteases dependentes de cálcio, induzindo degeneração tecidual (Charge e Rudnicki 2004). As calpaínas, por exemplo, são proteases neutras activadas pelo cálcio, que estão implicadas neste processo, e que são associadas aos processos iniciais de degeneração ocorridos nos sarcómeros musculares (Zimowska *et al.* 2001), danificando proteínas miofibrilares e proteínas do citoesqueleto

(Sultan *et al.* 2000). De facto, estudos *in vitro* demonstraram que as calpaínas podem danificar um grande número de constituintes miofibrilares, entre os quais a proteína C, a troponina I e T e a tropomiosina, os quais desempenham um papel determinante na estabilidade dos filamentos finos e espessos do sarcómero (para refs ver Goli *et al.* 2002). De forma idêntica, várias proteínas do citoesqueleto, tais como, a talina, a espectrina, a desmina e a vimentina, são rapidamente danificadas por acção das calpaínas (Saido *et al.* 1994; Belcastro *et al.* 1998; Huang e Forsberg 1998). Efectivamente, vários estudos (Ebbeling e Clarkson 1989; Sultan *et al.* 2000; Farges *et al.* 2002) sugerem que as alterações degenerativas observadas logo após lesão ocorrem através de uma via não lisossomal, conferindo às calpaínas um papel fundamental nesse processo.

No músculo esquelético, as calpaínas localizam-se preferencialmente na proximidade das linhas Z e, em menor quantidade, na banda I (Belcastro *et al.* 1998; Goli *et al.* 2002). Desta forma, e como resultado da acção destas enzimas proteolíticas, ocorre uma progressiva disrupção da linha Z, com subsequente libertação dos filamentos de actina e de miosina para a superfície da miofibrila, ocorrendo também produção de numerosos fragmentos de desmina, neblina e de outros substractos das calpainas (Ebbeling e Clarkson 1989). Para além da activação de proteases neutras como as calpaínas, a perda de homeostasia ao ião cálcio promove outros processos de autodegradação celular como a activação da fosfolipase A2 a qual, conseqüentemente, afecta a integridade e estabilidade das membranas celulares (Armstrong *et al.* 1991; Duarte *et al.* 1992). Adicionalmente, o incremento na concentração de cálcio sarcoplasmático pode também desencadear a sua acumulação no interior da mitocôndria, o que poderá induzir **desacoplação** da fosforilação oxidativa com conseqüente diminuição na taxa de síntese de ATP. Assim, a capacidade da célula em produzir energia poderá afectar as bombas dependentes de ATP existentes em todas as membranas celulares (Ebbeling e Clarkson 1989; Kuipers 1994).

Desta forma, a desregulação do gradiente iónico de cálcio conduz à perda da viabilidade da fibra muscular, associada a uma série de alterações estruturais e ultra-estruturais que podem ser visualizadas, quer por microscopia óptica, quer por microscopia electrónica.

Após um estímulo lesivo, sinais de degeneração muscular, tais como, disrupção da arquitectura dos sarcómeros, vacuolização sarcoplasmática e a presença de núcleos picnóticos, podem ser observados com recurso à microscopia óptica (Winchester e

Gonyea 1992; Rushton *et al.* 1997). Minamoto *et al.* (1999), utilizando como modelo de indução de lesão o esmagamento muscular, observaram a presença de miofibras hipercontraídas, infiltração celular e áreas claras entre as fibras musculares, um dia após o trauma.

As alterações das fibras lesadas após um estímulo lesivo, podem ser identificadas de uma forma mais minuciosa através da utilização da microscopia electrónica. Este tipo de alterações observadas no tecido muscular tem sido descrito em diferentes modelos experimentais de indução de lesão (Newham *et al.* 1983; Gibala *et al.* 1995; Friden e Lieber 1998; Roth *et al.* 1999; Roth *et al.* 2000) e incluem a degeneração e a extensão das linhas Z para as bandas I adjacentes, o *swelling* da mitocôndria e do retículo sarcoplasmático, a disrupção da arquitectura dos sarcómeros, o aumento do espaço interfibrilar e a lesão do sarcolema (Ebbeling e Clarkson 1989; Phillips e Knighton 1990; Appell *et al.* 1992; McCutcheon *et al.* 1992; Friden e Lieber 1998; Magaouda *et al.* 2004).

A fase de degeneração intrínseca é seguida por uma segunda fase de degeneração, a fase de degeneração extrínseca, mediada por uma resposta inflamatória com invasão de células do sistema imunológico (Carlson 2001). Os neutrófilos são as primeiras células a invadir o músculo lesado, estando descrito um aumento significativo do seu número 1-6 horas após o final do exercício ou, por exemplo, da injeção de miotoxina (para refs ver Charge e Rudnicki 2004). A mieloperoxidase (MPO), principalmente armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, tem sido frequentemente utilizada como marcador indirecto da presença deste tipo de células inflamatórias (Suzuki *et al.* 1996; Brickson *et al.* 2001; Kyriakides *et al.* 2001).

Doze a quarenta e oito horas após a lesão e após infiltração de células polimorfonucleadas, os monócitos/macrófagos tornam-se predominantes nos tecidos lesados (Merly *et al.* 1999; Seale e Rudnicki 2000; Charge e Rudnicki 2004). Os macrófagos infiltrados na área lesada, fagocitam os detritos celulares das fibras musculares lesadas e, segundo Leufaucheur e Sébbille (1995), apresentam o seu pico máximo de actividade nos 3^o e 4^o dias após a lesão. Este influxo de leucócitos parece ser estimulado pela libertação de diversos factores de crescimento associados com a lesão da matriz extracelular, tais como, o factor de crescimento fibroblástico (FGF) e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Carlson 2001). Esta invasão leucocitária dos músculos agredidos, caracterizada pela elevada actividade fagocítica, pela activação e exocitose de enzimas proteolíticas e pela produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio (EROs), contribui para o aumento do catabolismo proteico, remoção do tecido

lesado e estimulação do processo de regeneração muscular (Armstrong *et al.* 1991; Duarte *et al.* 1994; Gleeson *et al.* 1995; Pizza *et al.* 2001; Pizza *et al.* 2002). Efectivamente, para além de fagocitarem as células ou detritos celulares que sofreram necrose, os macrófagos secretam uma variedade de factores de crescimento [FGF, TGF- β (factor de crescimento transformador β); LIF (factor inibidor leucémico) e interleucinas] que activam as células satélite (Lefaucheur e Sebille 1995; Seale e Rudnicki 2000; Vierck *et al.* 2000). O papel desempenhado pelos monócitos/macrófagos durante o processo regenerativo é suportado pela observação de que a regeneração é marcadamente diminuída na ausência de infiltração por este tipo de células inflamatórias (Seale e Rudnicki 2000).

A necrose das fibras musculares e o aumento do número de células não musculares dentro da área lesada parecem, assim, constituir-se como as principais características histológicas dos eventos iniciais após lesão (Charge e Rudnicki 2004). Simultaneamente, com o pico de invasão dos monócitos/macrófagos, ocorre a maior fase de activação e proliferação de células satélite (Phillips e Knighton 1990; Carlson 2001). No entanto, e embora a natureza exacta do processo de sinalização que determina o momento em que as CS se tornam activas ainda não esteja completamente esclarecida (Allen *et al.* 1999), parece que a síntese de factores de crescimento têm grande influência neste processo (Villena e Brandan 2004). De facto, vários estudos (Bischoff 1990; Merly *et al.* 1999; Hawke e Garry 2001; Villena e Brandan 2004; Zhao e Hoffman 2004) têm demonstrado que os factores de crescimento libertados, quer pelas fibras danificadas, quer pelos monócitos/macrófagos, durante o processo fagocítico, têm um papel determinante na proliferação e na diferenciação das CS. Estes pequenos péptidos, ao ligarem-se a receptores de membrana e ao activarem múltiplas vias de sinalização, parecem influenciar as várias etapas do crescimento e desenvolvimento das células (Menetrey *et al.* 2000).

A maioria dos estudos que examinam o efeito dos factores de crescimento no comportamento das CS tem utilizado culturas de células satélite (Allen e Rankin 1990). Neste sentido, estudos *in vitro* utilizando factores de crescimento verificaram que estes factores actuam em diferentes etapas do processo de regeneração muscular. Por exemplo, os factores de crescimento IGF-I e IGF-II estimulam a proliferação e a sua diferenciação em miotúbulos (Hawke e Garry 2001). O papel do IGF-I durante o processo regenerativo é suportado por estudos onde a infusão directa deste factor de crescimento no músculo de rato, conduz a um aumento da massa muscular, resultante do incremento

do conteúdo proteico e de DNA muscular (Adams e Haddad 1996; Adams e McCue 1998; Chakravarthy *et al.* 2000). Outros factores de crescimento, como o HGF e FGF, para além de estimularem as CS quiescentes a entrarem em ciclo celular, inibem a sua diferenciação (Chen e Goldhamer 2003; Charge e Rudnicki 2004). Estes últimos podem ser libertados na matrix extracelular após lesão da lâmina basal e têm um papel determinante nas fases iniciais do processo regenerativo (Merly *et al.* 1999; Zhao e Hoffman 2004). No caso particular do HGF, sabe-se que, para além de induzir a proliferação das CS, funciona também como agente quimiotático para este tipo celular (Bischoff 1997; Vierck *et al.* 2000). O factor de crescimento TGF- β , por seu lado, parece ter um papel importante na regulação do crescimento celular. Efectivamente, os membros da família TGF- β controlam a actividade mioblástica inibindo, quer a sua proliferação, quer a sua diferenciação. O efeito inibitório deste factor de crescimento no crescimento muscular tem sido demonstrado em diversos estudos com ratos *Knockout* TGF- β . De facto, os animais sujeitos a esta mutação genética exibem sistematicamente evidências claras de hipertrofia e hiperplasia (McPherron e Lee 1997).

Adicionalmente, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado a importância dos factores IL-6 (interleucina 6) e LIF no processo regenerativo do tecido muscular esquelético (Kurek *et al.* 1997; Kurek *et al.* 1998; Gregorevic *et al.* 2002). A citocina LIF estimula a proliferação dos mioblastos em cultura, mas não afecta a sua diferenciação e fusão (para refs ver Charge e Rudnicki 2004). A regeneração muscular esquelética após lesão é atenuada em ratos com mutação no gene que codifica para a LIF, enquanto que a administração exógena de LIF estimula o processo regenerativo (Kurek *et al.* 1997). Por seu lado, embora a IL-6 promova a estimulação de mioblastos *in vitro*, quando injectada em músculos lesados não desencadeia o processo regenerativo, parecendo estimular apenas células não musculares, como por exemplo os fibroblastos adjacentes à fibra muscular (Kurek *et al.* 1998). Adicionalmente, o papel da IL-6 na regeneração muscular parece estar igualmente associado com o envolvimento de respostas imunológicas e de reacções de fase aguda (Kurek *et al.* 1998).

Assim sendo, entre os diversos factores de crescimento mais importantes na estimulação das CS, parecem encontrar-se o HGF, FGF, PDGF, LIF, IGFI e IGFII. Como foi referido anteriormente, muitos dos factores de crescimento que estimulam a proliferação inibem a diferenciação das fibras musculares, prolongando assim o tempo durante o qual são recrutadas células precursoras miogénicas (Carlson 2001).

De forma a participarem no processo regenerativo, as CS tem de ser capazes de migrar. Existem evidências da migração das CS para a área danificada (Maley *et al.* 1995) em resposta a gradientes de concentração de vários factores solúveis libertados durante a lesão muscular (Allen *et al.* 1999). Os factores de crescimento HGF e TGF β exibem uma actividade quimiotática significativa (Bischoff 1997), podendo ter um papel relevante na migração das CS em direcção ao músculo danificado.

Como resultado da libertação de factores de crescimento quer pelas fibras lesadas, quer pelos macrófagos, as CS tornam-se mitoticamente activas dois dias após a lesão inicial e o aumento de sua actividade proliferativa continua por mais de 10 dias (Esser e White 1995). Segundo Hawke e Garry (2001), as CS começam a tornar-se activas 6 horas após lesão induzida com cardiotoxina, ocorrendo o seu pico máximo de activação nos 2 a 3 dias posteriores à indução de lesão. Kirk *et al.* (2000) referem que as células mononucleares, englobando as CS e as células responsáveis pela fagocitose, são mais numerosas entre os dias 1 e 5 após injeção com notoxina e encontram-se presentes no espaço intersticial e no interior das fibras danificadas. Importa ainda salientar que a activação das CS não é restrita apenas ao local da lesão, uma vez que a lesão numa extremidade de uma fibra, parece activar as CS existentes ao longo de toda essa fibra (Schultz 1989). Adicionalmente, se o estímulo que provoca a lesão for perpendicular à direcção das miofibras, algumas CS são capazes de atravessar a membrana basal das miofibras não danificadas e de migrar transversalmente para o local da lesão (Bischoff 1997). Efectivamente, as CS expressam várias proteases capazes de degradar a membrana basal, facilitando, assim, o seu deslocamento para a área lesada (Allen *et al.* 1999). As CS são também capazes de se mover entre músculos adjacentes quando ocorre ruptura do tecido conjuntivo (Bischoff 1997).

Simultaneamente à activação das CS, os fibroblastos começam a proliferar e iniciam a produção de colagénio, restaurando o tecido conjuntivo danificado (Menetrey *et al.* 2000). Nos casos de lesão extensa, os fibroblastos proliferam rapidamente, levando à formação de um tecido denso de cicatrização, impedindo a regeneração completa do tecido muscular danificado (Peng e Huard 2004).

A seguir ao período de proliferação, as CS abandonam o ciclo celular, migram e começam a fundir-se entre si ou com as fibras musculares adjacentes, originando miotúbulos multinucleados (Armand *et al.* 2003; Carlson 2003). Três ou quatro dias após

a lesão começam a surgir os primeiros miotúbulos multinucleados aumentando o seu número acentuadamente até ao décimo dia (Chambers e McDermott 1996). Este processo de diferenciação celular é promovido pelo IGF-I e por factores reguladores miogénicos, tais como a Miogenina (Carlson 2001). Após a diferenciação, as novas fibras formadas são de pequeno calibre e possuem núcleos centrais (Goetsch *et al.* 2003). Estas miofibras são basófilas, reflectindo a elevada síntese proteica, sobretudo de proteínas contrácteis típicas do período embrionário (Charge e Rudnicki 2004). De facto, segundo Keller *et al.* (1999), 10 dias após lesão induzida pela realização de exercício excêntrico, mais de 10% das fibras exibem núcleos centrais e expressam isoformas de miosinas de cadeia pesada (MHC) típicas do período embrionário. De forma idêntica, Whalen *et al.* (1990) detectaram formas de MHC embrionárias e neonatais entre o terceiro e o décimo quarto dia após injeção de toxinas no músculo *soleus*.

No que diz respeito à expressão de proteínas contrácteis durante o processo regenerativo, importa salientar que esta é similar à que ocorre durante o desenvolvimento muscular (Esser e White 1995). Assim sendo, as fibras regeneradas repetem a sequência de transições de isoformas que ocorrem no músculo embrionário, i.e., após a expressão inicial de MHC embrionárias e de MHC neonatais pelos miotúbulos jovens ocorre a expressão de MHC adultas pelas fibras musculares maduras (Carlson 2001). As propriedades contrácteis do músculo reflectem esta sequência de transformações bioquímicas. De facto, num músculo recém regenerado a velocidade de contracção é mais lenta, correspondendo a um alto conteúdo em MHC embrionária. A transição para as isoformas de MHC adultas resulta num aumento da velocidade de contracção das fibras musculares (Carlson 2001).

Com o amadurecimento das fibras musculares, estas aumentam de tamanho e os seus mionúcleos começam a migrar para a periferia celular (Phillips e Knighton 1990; Charge e Rudnicki 2004). No caso de a lesão afectar a enervação das fibras musculares, a completa maturação estrutural e funcional do músculo regenerado requer a sua re-nervação, já que na ausência de enervação, dependendo das espécies, as fibras musculares regeneradas sofrem atrofia (Carlson 2003).

Na maioria dos casos em que o processo regenerativo se desenvolve com normalidade, o músculo regenerado é morfológica e funcionalmente semelhante ao músculo não danificado.

Embora seja consensual que os eventos degenerativos que ocorrem logo após um estímulo lesivo sejam atribuídos a fenómenos de necrose, a apoptose parece também desempenhar um papel importante na eliminação de alguns tipos de células presentes no músculo esquelético, em determinadas etapas da regeneração muscular.

As características morfológicas de uma célula apoptótica variam consideravelmente das de uma célula em necrose. Na necrose, a lesão da membrana plasmática origina extensa tumefacção e lise celular. O processo de necrose é acompanhado por perda de viabilidade de organelos chave, como as mitocôndrias, o que desencadeia depleção de ATP celular. Adicionalmente, este processo está associado a uma resposta inflamatória intensa, necessária para a remoção dos detritos celulares (Primeau *et al.* 2002). Em contraste, as características morfológicas associadas ao processo apoptótico incluem a desintegração da célula em corpos apoptóticos, contendo organelos intactos, que posteriormente serão removidos pelas células circundantes por fagocitose, sem intervenção de resposta inflamatória (Sandri *et al.* 1999; Primeau *et al.* 2002; Adhietty e Hood 2003; Lawen 2003; Rizzuto *et al.* 2003). Assim, durante o processo apoptótico, as células que são destinadas a morrer, são removidas sem comprometer a integridade das células circundantes pelo processo de degeneração extrínseca.

Uma grande variedade de sinais externos e internos regulam a expressão dos genes que controlam a apoptose (Phaneuf e Leeuwenburgh 2001). Desta forma, o processo apoptótico pode ser induzido por duas vias principais de sinalização: a via extrínseca, por activação de “receptores de morte” localizados na membrana plasmática, e a via intrínseca, que tem origem na mitocôndria (Primeau *et al.* 2002; Adhietty e Hood 2003). Ambas as vias de sinalização convergem na activação de enzimas proteolíticas específicas (caspases) responsáveis pela degradação de alvos citoplasmáticos e nucleares, desencadeando as alterações estruturais observadas no processo apoptótico (Lawen 2003).

A apoptose é um processo activo que permite o desenvolvimento normal e a homeostasia de um tecido através da eliminação de células não desejáveis ou danificadas (Niinobu *et al.* 2000; Ruest *et al.* 2002b; Shiokawa *et al.* 2002; Yuan *et al.* 2002; Adhietty e Hood 2003). Efectivamente, o processo apoptótico decorrente do desenvolvimento muscular é considerado essencial para eliminar células com anomalias ou que foram danificadas durante o processo de diferenciação (Shiokawa *et al.* 2002). Nos mamíferos, incluindo os humanos, durante as fases iniciais do desenvolvimento muscular, mais de 40% das

células são eliminadas por apoptose (Podhorska-Okolow *et al.* 1998). A apoptose de mioblastos é um processo fisiológico que ocorre durante a miogénese e durante a regeneração muscular, desempenhando uma função importante na remoção dos mioblastos que se encontram em excesso (Dee *et al.* 2002). Durante o desenvolvimento muscular, um conjunto de mioblastos em proliferação abandona o ciclo celular diferencia-se e torna-se resistente à apoptose, enquanto que uma grande quantidade destas células precursoras é eliminada por este processo (Kamradt *et al.* 2002). Desta forma, a capacidade de escapar ao processo apoptótico parece estar associada com a saída do ciclo celular e com a estabilização num estado pós-mitótico, o que requer uma sobre-regulação do inibidor das Cdks (p21) e a hipofosforilação da pRb. (Kamradt *et al.* 2002; Ruest *et al.* 2002b; Shiokawa *et al.* 2002; Shen *et al.* 2003). Efectivamente, os mioblastos após diferenciação expressam miogenina e p21 e apresentam resistência ao processo apoptótico (Shiokawa *et al.* 2002). Em adição, estudos recentes (para refs ver Kamradt *et al.* 2002) demonstraram que a sobre-expressão da serina-treonina cinase (Akt) parece proteger os mioblastos da apoptose durante o processo de miogénese. Segundo Dominov *et al.* (1998), também a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, identificada nas fases iniciais da miogénese, inibe este processo de morte celular e, concomitantemente, promove a proliferação celular. Estes autores sugerem que a expressão de Bcl-2 é importante para a longa sobrevivência das células precursoras musculares e para o processo de regeneração muscular.

Embora exista uma extensa quantidade de literatura que associe o processo apoptótico dos mioblastos com o desenvolvimento muscular, poucos são os estudos que evidenciam a importância da apoptose na regeneração muscular esquelética. Estudos utilizando o exercício físico com predomínio de contracções excêntricas como forma de lesão muscular (Sandri *et al.* 1995; Podhorska-Okolow *et al.* 1998), evidenciam a ocorrência da apoptose, sobretudo nas fases iniciais do processo degenerativo. Contudo, a forma através da qual o processo apoptótico é activado em músculos adultos, como resultado do exercício físico ou de outras formas de stress mecânico, é ainda desconhecida (Primeau *et al.* 2002). Podhorska-Okolow *et al.* (1998), observaram que a apoptose ocorria em músculos adultos após o exercício físico, sendo este processo evidenciado pela presença de núcleos com forma irregular e cromatina condensada ao longo da superfície interna da membrana nuclear, consistentes com as características morfológicas apresentadas por mionúcleos apoptóticos, enquanto que a membrana plasmática e as proteínas contrácteis se encontravam preservadas. Neste estudo, os

dados estruturais foram reforçados pela incidência, no grupo exercitado, comparativamente ao controlo, de núcleos positivos marcados com TDT (*terminal desoxinucleotidil transferase*), um indicador da fragmentação da dupla cadeia do DNA. Adicionalmente, a análise por Western blotting de proteínas anti e pró-apoptóticas (Bcl-2 e Bax, respectivamente), mostraram um decréscimo nos níveis de Bcl-2 e um aumento nos níveis de Bax logo após o exercício físico, sugerindo assim a presença de um processo apoptótico após este estímulo (Podhorska-Okolow *et al.* 1998). Já anteriormente, Sandri *et al.* (1995), tinham demonstrado, com recurso a electroforese em gel de agarose, que ocorria fragmentação internucleossomal de DNA em músculos de ratos *mdx* quarenta e oito horas após exercício físico de longa duração. As explicações plausíveis para a indução de apoptose em músculos adultos, após a realização de exercício físico prendem-se com: 1) o aumento do metabolismo muscular e, conseqüente, aumento da produção de EROs, 2) com o aumento dos níveis intracelulares de cálcio 3) com o aumento da secreção de glucocorticoides. Estes estímulos podem funcionar, isolada ou conjuntamente, como sinais intracelulares na indução do processo apoptótico (Phaneuf e Leeuwenburgh 2001; Adhihetty e Hood 2003).

Outros métodos de indução de degeneração e conseqüente regeneração muscular foram aplicados com o intuito de verificar a ocorrência ou não do processo apoptótico. Olivé e Ferrer (2000), recorreram à injeção de metoclopramida com o propósito de induzir lesão e analisaram, por imunohistoquímica, os níveis das proteínas anti e pró-apoptóticas, Bcl-2 e Bax, respectivamente. Os resultados deste estudo mostraram que 80% das fibras musculares regeneradas, identificadas pelo seu pequeno tamanho e pela presença de núcleos centrais, apresentaram moderada imunoreactividade ao Bax no seu citoplasma, mantendo-se esta marcação mesmo nas fases finais do processo regenerativo. Pelo contrário, as miofibras regeneradas não foram marcadas com o anticorpo anti-Bcl-2. Também as células fagocíticas que começaram a surgir, aproximadamente vinte e quatro horas após a indução de lesão, apresentaram baixa imunoreactividade para o Bcl-2 e forte marcação relativamente ao Bax. Contudo, e em oposição ao observado relativamente à proteína pró-apoptótica Bax, os núcleos das fibras musculares esqueléticas não apresentaram características morfológicas típicas de um processo apoptótico. Atendendo ao descrito, Olivé *et al.* (2000) sugeriram que a sobre-expressão da proteína Bax, não estava necessariamente ligada ao processo apoptótico, mas sim ao processo de regeneração muscular.

A caspase 3, um importante marcador de apoptose, parece ser apenas activada nas fases finais deste processo de morte celular e, uma vez activa, pode clivar numerosos substratos (Ruest et al. 2002a). No entanto, Fernando *et al.* (2002), utilizando culturas C2C12 de mioblastos, mostraram que a caspase 3 é também requerida para o processo de diferenciação mioblástica. Efectivamente, estes autores verificaram que após indução da diferenciação em culturas de mioblastos caspase 3^{-/-}, ocorria uma acentuada diminuição na formação de miotúbulos e na expressão de proteínas específicas do processo de diferenciação (Fernando *et al.* 2002). De forma idêntica, Mogi e Togari (2003), referem que a activação das caspases é essencial para o processo de diferenciação osteoblástica. A observação de que as alterações celulares associadas à diferenciação celular evidenciavam alto grau de similaridade com as alterações fenóticas usualmente descritas para a apoptose (Fernando *et al.* 2002; Mogi e Togari 2003) levou à sugestão de que a indução destes dois processos, utilizava mecanismos celulares sobrepostos. Efectivamente, a proteína p38, da família da MAPK (*mitogen - activated protein kinase*) tem sido implicada não só na indução da diferenciação muscular, mas também na iniciação e progressão do processo apoptótico (Molkentin *et al.* 1995; Cuenda e Cohen 1999).

Adicionalmente, Ruest *et al.* (2002a) mencionaram que a caspase-3 está presente durante o desenvolvimento muscular, particularmente em animais neonatais, e que a sua expressão decresce gradualmente, acabando por desaparecer em animais com um ou mais meses de idade, embora continue abundante o mRNA que codifica para esta proteína. Estes autores referem ainda que a regulação da caspase-3 é um processo flexível, uma vez que esta proteína reaparece em músculos regenerados (após injeção com marcaína), mas torna-se indetectável mal o processo de regeneração esteja completo. Em adição, sugerem que a caspase-3 poderá desempenhar um papel importante na remoção do excesso de CS em proliferação, ou na eliminação de miofibras enervadas inadequadamente (Ruest et al. 2002a).

A apoptose das células inflamatórias também parece ser determinante na progressão do processo regenerativo. Efectivamente, Sandri *et al.* (2001), demonstraram que a regeneração muscular é drasticamente diminuída quando o processo apoptótico das células fagocíticas está ausente devido à inibição do FasL (ligando Fas), citocina que medeia a apoptose via ligação ao seu receptor Fas. Estudos *in vitro* mostraram que as células inflamatórias sofrem apoptose via FasL (Kiener et al. 1997) e que a resolução do processo inflamatório ocorre através da apoptose deste tipo de células inflamatórias

(Tidball e St Pierre 1996; Niinobu *et al.* 2000). Sandri *et al.* (2001) observaram ainda que as células fagocíticas aumentam progressivamente do dia 2 para o dia 4 pós lesão, fenómeno este que ocorre em paralelo com a expressão de FasL. Adicionalmente, o número de células positivas para o factor de transcrição MyoD, observado durante o referido período, sugere que o FasL é principalmente expresso nos mioblastos. Sandri *et al.* (2001) concluíram que o FasL é o factor chave na resolução da inflamação muscular e que quando as células inflamatórias permanecem nos tecidos, funcionam como um grande obstáculo para a sobrevivência dos mioblastos e para a sua diferenciação em miofibras multinucleadas.

3.1.2. Modelos experimentais de indução de lesão

O processo de regeneração muscular tem sido estudado utilizando diferentes modelos de indução de degeneração e conseqüente reparação. Os métodos mais utilizados com o referido propósito incluem: o transplante de músculos envolvendo a sua desnervação, a isquemia e a tenotomia (Carlson 1986), o trauma directo, com recurso à utilização de lacerações, de contusões e de tensões mecânicas (Armand *et al.* 2003), a aplicação local de anestésicos como a bupivacaína (marcaina) ou toxinas venenosas (notoxina ou cardiotoxina) (Lefaucheur e Sebillé 1995), a oclusão de artérias ou veias (para refs ver Rushton *et al.* 1997) e a utilização de exercício com predominância de contracções excêntricas (Armand *et al.* 2003). Em todos estes processos indutores de lesão, a fase degenerativa e a fase regenerativa são bastantes similares apesar da cinética e da amplitude de cada uma destas fases depender da extensão da lesão, do tipo de músculo lesado e do modelo animal utilizado (Charge e Rudnicki 2004).

O primeiro método utilizado com o intuito de estudar o processo regenerativo, consistia na remoção de um músculo, na sua trituração em pequenos pedaços e posterior recolocação no seu leito inicial (Carlson 1986; Carlson 2001; Carlson 2003). Embora este modelo de indução de lesão fosse adequado para estudar as fases iniciais do processo regenerativo, tornava-se insatisfatório quando o interesse recaía no estudo das propriedades contrácteis do músculo regenerado, uma vez que ocorria extensa deposição de tecido conjuntivo (para refs ver Carlson 2003). Dadas as limitações inerentes a este método, novas metodologias foram desenvolvidas. Assim sendo, um outro modelo que começou a ser utilizado com maior sucesso foi o transplante do

músculo inteiro, i.e., o órgão é completamente removido do seu leito, implicando corte nos tendões, vasos sanguíneos e nervos, e posteriormente colocado no seu local inicial. Contudo, e embora a disrupção da arquitectura interna muscular fosse mínima, as propriedades funcionais do músculo regenerado não eram muitas vezes completamente restabelecidas (Carlson 1986).

Mais recentemente, um outro modelo de indução de lesão muscular que tem sido aplicado recorre à utilização de substâncias tóxicas. Efectivamente, apesar do músculo esquelético ser um tecido bastante sensível a efeitos tóxicos (McLoon et al. 1998; Carlson 2003) as CS parecem ser resistentes a esta toxicidade. Deste modo, a injeção local de miotoxinas, tais como bupivacaina, cardiotoxina e notexina, têm sido frequentemente utilizadas com o propósito de induzir lesão muscular e posterior estudo do processo regenerativo (Lefaucheur e Sebillé 1995; Armand *et al.* 2003; Harris 2003; Hill *et al.* 2003). A notexina é uma fosfolipase A₂, extraída de veneno de cobra, e que bloqueia a transmissão neuromuscular (Charge e Rudnicki 2004), enquanto que a cardiotoxina induz a despolarização e a degradação da membrana plasmática (Harris 2003). A utilização destas toxinas com o intuito de induzir lesão muscular desencadeia apenas disrupção dos sarcómeros e do sarcolema, não danificando a lâmina basal das fibras, o que torna o processo regenerativo mais veloz (Fink *et al.* 2003; Harris 2003). De facto, é do conhecimento geral que a lesão induzida com toxinas provenientes de veneno de cobra, induz uma rápida e extensiva necrose das miofibras, seguida por um processo regenerativo igualmente célere (Lefaucheur e Sebillé 1995). No entanto, embora esta metodologia de indução de lesão seja um método fácil e reproduzível, são ainda desconhecidos os efeitos destas toxinas nos vários tipos de células existentes no tecido muscular (Charge e Rudnicki 2004).

Existem ainda métodos alternativos à injeção de miotoxinas que são, possivelmente, mais relevantes do ponto de vista fisiológico (Charge e Rudnicki 2004). Efectivamente, o exercício com predominância de contracções excêntricas, o trauma físico por esmagamento do músculo e o congelamento, são modelos particularmente severos na indução de lesão muscular e que apresentam relevância do ponto de vista fisiológico. No exercício excêntrico, por exemplo, apesar de existir lesão muscular e consequente activação das células satélite (Appell *et al.* 1992; Friden e Lieber 1998), o ambiente muscular não é afectado pelo procedimento experimental e, assim, representa um bom modelo fisiológico para analisar a regeneração muscular (Armand *et al.* 2003).

Os modelos mais comuns para induzir lesão muscular envolvem meios directos que recorrem a processos como o congelamento ou o esmagamento do músculo (Rushton *et al.* 1997). Contudo, o trauma por esmagamento muscular recorrendo a *forceps*, embora vulgarmente utilizado na literatura, não produz lesões musculares consistentes (Rushton *et al.* 1997). Como alternativa, e tendo em consideração que no decurso da prática de diversas actividades desportivas o músculo esquelético é frequentemente sujeito a contusões, resultante do impacto severo de um objecto não penetrante (Crisco *et al.* 1994), métodos não invasivos de indução lesão muscular para estudar o processo regenerativo têm sido recentemente utilizados (Minamoto *et al.* 1999). Neste sentido, Crisco *et al.* (1994) desenvolveram um modelo reproduzível de contusão não invasivo que consiste na queda de uma massa através de um tubo cilíndrico sobre uma outra esfera colocada em contacto directo com a superfície da porção média do músculo *gastrocnemius* do rato. Estes investigadores estudaram as alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas do músculo afectado e demonstraram que este modelo induz uma lesão significativa no músculo. Estudos mais recentes recorreram, de igual forma, a este modelo não invasivo de induzir lesão muscular com diferentes propósitos. Efectivamente, Beiner *et al.* (1999) utilizou o modelo de contusão para verificar o efeito de esteroides anabólicos e de corticoesteróides no processo regenerativo após indução da lesão. Minamoto *et al.* (1999), por seu lado, estudaram o efeito de uma contusão simples e periódica no músculo *soleus* de rato em diferentes estados do processo regenerativo. Embora a lesão induzida por este modelo de esmagamento resulte num trauma severo que inclui a lesão da lamina basal, das terminações nervosas e a ruptura de vasos sanguíneos (MacGregor e Parkhouse 1996) acarretando, um processo regenerativo mais lento quando comparado com outros modelos experimentais (Fink *et al.* 2003), o facto de ser um método directo, de fácil exequibilidade, não invasivo, reproduzível (Crisco *et al.* 1994; Beiner *et al.* 1999) e de resultar em lesão do tecido muscular idêntica à que ocorre em muitos atletas decorrente da prática de várias modalidades desportivas, justifica a sua ampla utilização como meio de degeneração do tecido muscular esquelético.

Uma vez que a maioria dos trabalhos experimentais (Crisco *et al.* 1994; Ferry *et al.* 1997; McLoon *et al.* 1998; Minamoto *et al.* 1999), que estudam o processo de regeneração muscular, restringem-se apenas à análise de 2 ou 3 momentos do referido processo, incidindo fundamentalmente nas fases iniciais e finais da regeneração, este trabalho experimental tem como principal objectivo estudar o processo regenerativo ao longo de

um período de vinte dias, após lesão muscular induzida por esmagamento do músculo *gastrocnemius*.

Subjacentes a este objectivo geral encontram-se três objectivos específicos:

- a) avaliar ao longo do tempo o processo regenerativo através da utilização de marcadores bioquímicos, de lesão/regeneração e de morte celular programada;
- b) analisar, ao longo do processo de regeneração muscular, o tipo de núcleos marcados e a sua quantidade através da imunohistoquímica; correlacionar os dados quantitativos da análise morfológica com os resultados bioquímicos de proliferação celular,
- c) analisar as alterações ultra-estruturais inerentes ao processo de regeneração, recorrendo à microscopia electrónica.

3.2. Material e Métodos

A - Protocolo experimental

Setenta e dois ratinhos macho Charles River, de 8 semanas de idade e com um peso médio entre 35 e 40 gramas, foram colocados em gaiolas individuais e aleatoriamente distribuídos em dois grupos: o grupo controlo (n=6) e o grupo experimental, no qual se induziu lesão muscular. O grupo experimental foi subdividido em 11 subgrupos (n=6) em função dos tempos de sacrifício após a indução de lesão (ver abaixo). Os animais foram aclimatizados durante uma semana e mantidos durante todo o protocolo a uma temperatura constante de 21°C e a um ciclo de luz/escuro de 12/12h.

A lesão muscular foi induzida pela queda de uma esfera metálica de 16 gramas através de um tubo cilíndrico de 1 metro de altura, sobre uma outra esfera igual colocada em contacto directo com a superfície da porção média dos músculos *gastrocnemius* de ambas as patas do rato (Wright-Carpenter *et al.* 2004). Tendo em conta os diferentes subgrupos experimentais, o sacrifício dos animais foi efectuado imediatamente e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias após a indução da lesão. Os animais pertencentes ao grupo controlo não foram submetidos a qualquer tipo de protocolo de lesão.

Todos os animais foram injectados com 50mg de BrDu/Kg de peso (B-9285), 48 horas antes do sacrifício.

Todos os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical. A cada um dos animais deste estudo, foi-lhe retirado um músculo *gastrocnemius* congelado de seguida a -80°C para a análise bioquímica e um músculo *gastrocnemius* processado de imediato para análise morfológica. É ainda de salientar que, uma vez que cada animal contribui com os seus dois músculos *gastrocnemius*, o número total de músculos utilizados para cada subgrupo do grupo experimental e para o grupo controlo foi de doze.

Todos os procedimentos seguiram as especificações e as recomendações do *National Institute of Health (NIH) Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

A.1. Análise Bioquímica

A.1.1. Preparação de extractos de músculo esquelético

O homogeneizado de músculo *gastrocnemius* foi obtido de acordo com o procedimento descrito por Cregan *et al.* (1999) com algumas modificações. Para o efeito, uma porção

de *gastrocnemius* foi homogeneizada num tampão de lise contendo 1 mM Na-EDTA, 1 mM Na-EGTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 25 mM HEPES (pH 7,5), suplementado no dia da experiência com 100 µM PMSF, 2 mM DTT, 1:100 cocktail anti-proteases e 0,05% Triton X-100. Após 30 minutos de incubação a 0°C, realizou-se uma centrifugação a 14000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi guardado a -80°C, após determinação do teor em proteína total, para posterior doseamento da actividade das calpaínas, da caspase-3, do teor em Bax, Bcl-2.

Para determinação da actividade da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetilglucosaminidase (NAG), o protocolo de extracção utilizado baseou-se no trabalho de Kyriakides *et al.* (2001). Assim, uma porção de *gastrocnemius* foi homogeneizada em tampão fosfato 20 mM com EDTA 1 mM, pH 7,4. Uma alíquota foi separada, centrifugada a 5000g durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi reservado para posterior determinação de proteína total e de NAG. O restante homogeneizado foi centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O pellet resultante foi ressuspenso em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamónio. Com o intuito de romper os grânulos dos neutrófilos e solubilizar a enzima em estudo, procedeu-se a uma sonicação de 10 segundos após a qual as amostras foram centrifugadas a 4000g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi diluído cinco vezes e utilizado para determinação da actividade da MPO.

A.1.1.1. Parâmetros bioquímicos

Determinação da actividade das calpaínas

A actividade das calpaínas foi efectuada de acordo com o procedimento descrito por Sultan *et al.* (2000). 30 µl de extracto do músculo *gastrocnemius* foi incubado durante 10 minutos a 37° C, numa solução tampão contendo 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de Ca²⁺, 1 mM de DTT, 10 µg/ml de Pefabloc e 10 µg/ml de pepstatin A (pH=7,4). Seguidamente, procedeu-se à adição de 5 µl de solução de substrato 50 mM [N-succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (SLY-AMC)] previamente diluído em dimetilsulfóxido, e fez-se o volume de 2 ml com a solução tampão (pH=7,4). A fluorescência do AMC libertado foi imediatamente medida num espectrofluorímetro (Hitachi F2000) durante 15 minutos a 37°C ($\lambda_{excitação} = 380nm$; $\lambda_{emissão} = 460nm$).

Paralelamente, determinou-se a actividade das calpaínas na ausência de CaCl₂ e na presença de 10 mM EDTA e 10 mM EGTA.

A actividade das calpaínas foi expressa em U/min de incubação/mg de proteína.

Determinação da actividade da caspase – 3

A determinação da actividade da caspase-3 nos homogeneizados de músculo baseou-se nos trabalhos de Cregan *et al.* (1999) segundo o procedimento descrito. Adicionou-se um volume de amostra correspondente a 100 µg de proteína a um tampão de sacarose com CHAPS (10% sacarose; 0,1% CHAPS; 25 mM HEPES pH 7,4) contendo 40 µM do substrato colorimétrico Ac-DEVD-pNA (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina; nº de catálogo 235400; Calbiochem). Após 2 horas de incubação a 37°C mediu-se a clivagem do substrato a 405 nm (Labsystem iEMS Reader MF). Os resultados foram expressos como o número de vezes acima do valor controlo o qual foi analisado simultaneamente. Ao controlo foi atribuído o valor 1.

Determinação dos níveis de Bax/Bcl-2

Com o intuito de avaliar os níveis de Bax/Bcl-2, quantidades equivalentes de proteína foram separadas por eletroforese monodimensional num gel SDS-PAGE de 15% de acordo com Laemmli (1970). As proteínas, depois de separadas, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) num tampão de Tris 25 mM, 0,2M glicina pH 8,3 e metanol 20%, durante 2 horas a 220 mA. Após a transferência procedeu-se ao bloqueamento dos locais de ligação não específica com uma solução de 5% de leite magro em pó em TBS-T (tampão de Tris 100 mM pH 8,0 com NaCl 1,5 mM e 0,5% de Tween 20) durante toda a noite a 4°C, seguindo-se a incubação da membrana com o anticorpo anti-Bcl-2 (1:500; sc-7382 *mouse monoclonal IgG*; Santa Cruz Biotechnology) ou anti-Bax (1:500; sc-493 *rabbit polyclonal IgG*; Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a membrana com TBS-T a fim de retirar o anticorpo não ligado covalentemente e procedeu-se à sua incubação com anticorpo secundário *peroxidase-conjugated anti-mouse* ou *anti-rabbit IgG antibodies* (Amersham Pharmacia Biotech) por um período de 2 horas. Após novas lavagens com TBS-T, a membrana foi tratada com reagentes de quimioluminescência (reagentes ECL; Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante, e exposta a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma). Depois de revelado, o filme foi digitalizado num densitómetro FX-710 (BioRad) e analisado no software QuantityOne da BioRad (versão 4.3.1.).

Doseamento da actividade da mieloperoxidase

A actividade da mieloperoxidase foi efectuada com base no estudo de Kyriakides *et al.* (2001). De acordo com o mesmo, adicionou-se o extracto de músculo, obtido segundo o procedimento acima descrito e já diluído cinco vezes ao tampão de reacção, constituído por fosfato 220 mM pH 5,4, NaCl 110 mM e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (T-2885; Sigma) 1,6 mM. A reacção foi iniciada por adição de peróxido de hidrogénio 3 mM tendo-se medido a variação de absorvância a 650 nm (Labsystem iEMS Reader MF) durante 3 minutos. Simultaneamente, construiu-se uma curva de calibração com padrões de MPO (M-6908; Sigma) e os resultados obtidos foram expressos em U/ mg de proteína.

Doseamento da actividade da N-acetil glucosaminidase

A N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) é uma enzima que está normalmente presente nos lisossomas celulares e, neste trabalho, a sua actividade foi determinada no homogeneizado de músculo utilizando o kit da Roche (nº de catálogo 875 406) que se baseia na hidrólise do 3-cresolsulfonaftaleinil-N-acetil- β -D-glucosaminida pela NAG com a libertação do 3-cresolsulfonaftaleina, de cor púrpura, cuja intensidade foi avaliada a 580 nm ($\epsilon_{580} = 40,67 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) num espectrofotómetro UV-Vis (Spectronic Genesys 5).

Doseamento da proteína total

Doseamento da proteína total pelo método de Lowry

Nos homogeneizados, onde foi determinada a actividade de NAG o doseamento das proteínas totais foi efectuada pelo método de Lowry (Lowry *et al.* 1951). As amostras foram previamente diluídas 5 vezes com o tampão de extracção e posteriormente adicionadas com o reagente de Biureto. Após aproximadamente 10 minutos de reacção, adicionou-se o reagente de Folin. Aguardou-se aproximadamente 20 minutos e leu-se a absorvância a 670 nm num leitor de placas (Labsystems iEMS Reader MF). Simultaneamente, foi efectuada uma curva de calibração com padrões de BSA (albumina sérica bovina), cujas concentrações variaram entre 0,0625 e 1 mg/ml.

Doseamento da proteína total pelo método de Sedmak

Nos homogeneizados de músculo onde se efectuaram os restantes parâmetros, a determinação do teor de proteínas totais foi efectuada pelo método de Sedmak (Sedmak e Grossberg 1977), uma vez que com este método os interferentes inerentes aos tampões são bastante atenuados.

A amostra foi inicialmente diluída 5 vezes com o tampão de extracção. Após a adição de 2 ml de reagente de Sedmak [0,06% de azul de Coomassie G250 em HClO₄ a 3% (m/v)] aguardou-se aproximadamente 15 minutos e leu-se a absorvência a 550 nm num leitor de placas (Labsystems iEMS Reader MF). Simultaneamente foi efectuada uma curva de calibração com padrões de BSA (albumina sérica bovina), cujas concentrações variaram entre 0,0625 e 1 mg/ml. De forma idêntica aos padrões, foi adicionado um volume de tampão de extracção com o intuito de eliminar o efeito deste no doseamento.

A.1.2. Determinação de células em proliferação pelo método de *South Western*

Extracção de DNA

Os músculos *gastrocnemius* foram cortados em pequenos pedaços de forma a permitir a extracção do seu DNA de acordo com o descrito no material e métodos do capítulo 2 (pág 17).

Avaliação das células em proliferação por *South Western*

A semi-quantificação das células mitoticamente activas foi efectuada utilizando um anticorpo anti-BrdU, de acordo com a metodologia desenvolvida por Knobloch *et al.* (2002) e descrita no material e métodos do capítulo 2 (pág 18).

A.2. Análise Morfológica

Determinação de células em proliferação por imunohistoquímica

De cada animal foi retirado um fragmento do músculo *gastrocnemius* para análise morfológica por imunohistoquímica. A preparação dos blocos foi efectuada de acordo com o descrito no capítulo 2 (pág 19).

As secções de tecido foram tratadas de forma idêntica ao descrito no material e métodos do capítulo 2 (pág 20).

Análise morfológica por microscopia electrónica

A preparação das amostras para microscopia electrónica foi efectuada de acordo com as técnicas descritas por Duarte (1993).

Após serem extraídos, os músculos foram seccionados e fixados durante 4 horas em gluteraldeído (2,5% de gluteraldeído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2-7,4). Seguidamente, procedeu-se à lavagem com uma solução de 0,1M de cacodilato de sódio durante aproximadamente 1 hora, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% durante 2 horas, e lavados novamente com a solução de 0,1M de cacodilato de sódio durante aproximadamente 1 hora. Em seguida, as amostras sofreram desidratação progressiva, sob a acção de concentrações crescentes de etanol durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos e impregnadas com epon durante 4 horas. O óxido de propileno foi o composto utilizado na transição desidratação/impregnação. Todos os procedimentos descritos foram efectuados à temperatura de 4°C.

Seguidamente procedeu-se à inclusão das amostras numa estufa a 60° C durante 2 dias. Foram efectuados cortes ultra-finos com uma espessura de 500 nm. Os cortes ultra-finos foram contrastados com uma solução aquosa saturada de acetato de urânio durante 30 minutos e com uma solução de citrato de chumbo durante 15 minutos, tendo-se procedido a lavagens no início e no final de cada um destes procedimentos.

O microscópio electrónico (Zeiss EMIOA) foi utilizado a 60kvolts.

Análise estatística

A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis. Nas determinações bioquímicas e morfológicas foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar a normalidade da distribuição. A análise de variâncias de medidas repetidas foi utilizada para comparar as diferenças entre os vários dias após a indução de lesão. O cálculo dos dados foi efectuado pelo *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

3.3 Resultados

Em primeiro lugar serão apresentados os resultados referentes aos parâmetros bioquímicos, e de seguida os resultados alusivos às alterações morfológicas, recorrendo quer à microscopia óptica, quer à microscopia electrónica.

A.1. Resultados de parâmetros bioquímicos

Pela análise da figura 8, verificou-se que as calpaínas apresentaram uma actividade máxima e significativamente diferente do controlo aos 2 dias após a indução de lesão, decrescendo de actividade a partir desse momento mas voltando a aumentar, embora ligeiramente, ao 10º dia pós trauma.

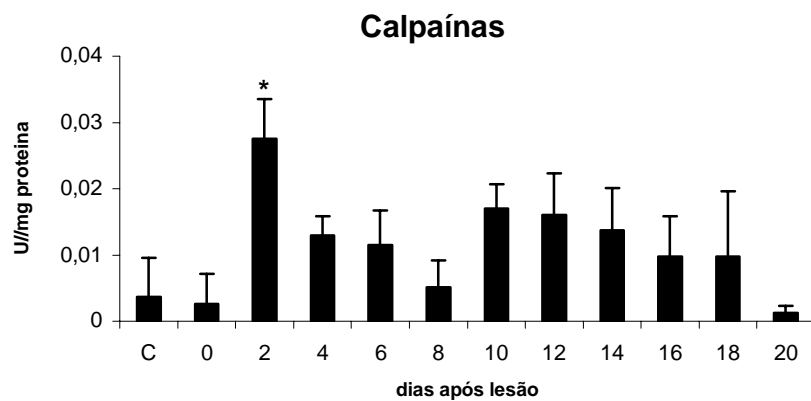


Figura 8 Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade das calpaínas por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.

* $p < 0,05$ vs controlo

Como se pode observar na figura 9 a actividade da mieloperoxidase comparativamente com o controlo, foi significativamente mais elevada nos dias 2, 4 e 20 após a indução de lesão. Importa ainda salientar que a actividade desta enzima foi significativamente mais elevada em relação a todos os momentos, 4 dias após a indução de lesão. Adicionalmente, verificou-se que a mieloperoxidase apresentou níveis elevados, embora de forma menos acentuada do que aos 4 dias, nos dias 2 e 20 após lesão.

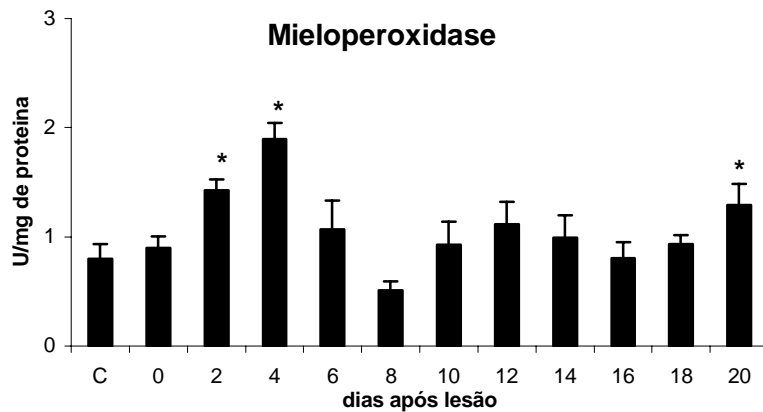


Figura 9 Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da mieloperoxidase por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.

* $p < 0,05$ vs controlo

Relativamente à actividade da enzima NAG (figura 10) verificou-se que, com excepção dos valores obtidos imediatamente, dez e dezasseis dias após indução de lesão, em todos os outros momentos foram obtidos valores significativamente mais elevados do que os registados no grupo de controlo. É ainda de salientar que os valores de actividade da NAG obtidos no segundo e no quarto dia, embora semelhantes entre si, são os mais elevados e diferem de forma significativa de todos os outros valores.

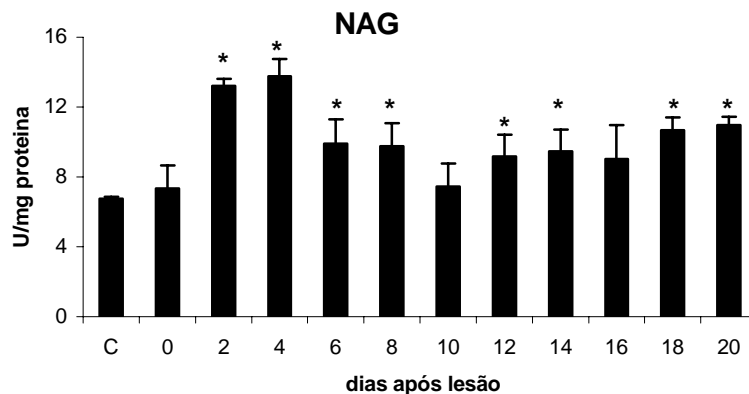


Figura 10 Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da N-acetilglucosaminidase (NAG) por mg de proteína, no grupo controlo (C) e nos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.

* $p < 0,05$ vs controlo

A actividade da caspase-3, com excepção da obtida imediatamente após a indução da lesão, foi significativamente mais elevada em todos os momentos de avaliação comparativamente ao grupo de controlo. Importa realçar que a actividade desta caspase apresentou valores acentuados de actividade nos 2, 4, 18 e 20 dias após a lesão.

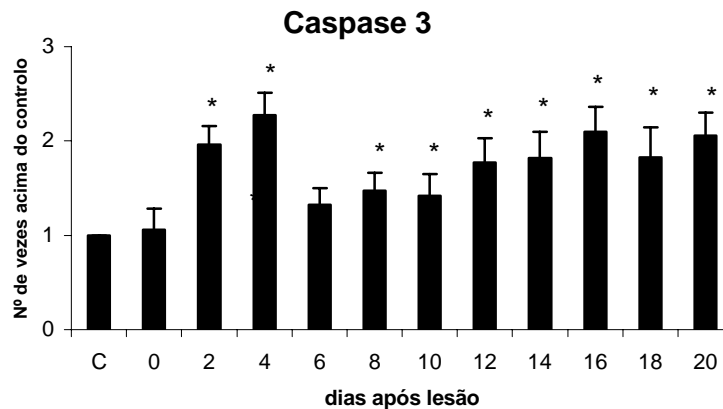


Figura 11 Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da actividade da caspase-3 expressa pelo número de vezes acima do controlo referente ao grupo controlo (C) e aos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.
* $p < 0,05$ vs controlo

No que concerne à expressão da proteína pró-apoptótica Bax, os valores de densidade óptica registados nos dias 4, 14, 16, 18 e 20 pós lesão são significativamente mais elevados do que os obtidos no grupo de controlo. Por seu lado, o valor obtido 4 dias após a indução de lesão é, ainda, significativamente superior aos registados nos dias 0, 2, 8, 10 e 12 pós lesão. É ainda importante destacar que os valores de densidade óptica obtidos aos 18 e aos 20 são significativamente mais elevados do que os registados imediatamente, dois, oito, dez, doze e quatorze dias após a indução de lesão.

Por seu lado, os níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, revelaram-se significativamente mais baixos nos dias 4, 6, 12, 14, 16, 18 e 20 pós lesão comparativamente ao controlo. De salientar ainda, que o valor registado oito dias após a lesão é significativamente mais elevado do que os obtidos nos dias 2, 4, 6, 12, 14, 16, 18 e 20 após a indução de lesão.

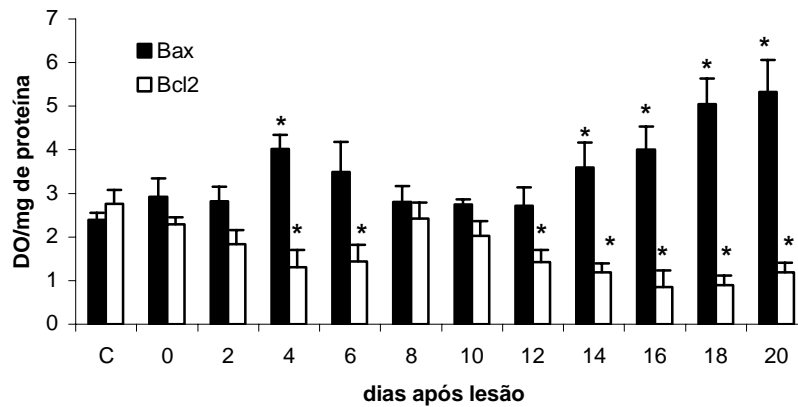


Figura 12 Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão de densidade óptica (DO) do Bax e do Bcl-2, referente ao grupo controlo (C) e aos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.

* p<0,05 vs controlo

Pela análise da tabela 4, verificou-se que a razão Bax/Bcl-2 se apresentou elevada ao 4^o dia pós lesão, mas particularmente mais acentuada no final do processo regenerativo.

Tabela 4 – Valores médios ± desvios padrão (DP) da razão Bax/Bcl-2 para o grupo controlo (C) e para os vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão, no músculo *gastrocnemius*.

Bax/Bcl-2												
Dias após lesão												
Grupos	C	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Média	0,87	1,27	1,53	3,07	2,43	1,16	1,35	1,90	3,02	4,69	5,63	4,50
DP	0,24	0,53	0,68	0,90*	1,03	0,66	0,52	0,82	,1,03*	1,36*	1,33*	1,29*

* p<0,05 vs controlo

No que diz respeito aos valores de densidade óptica referentes à marcação de células em proliferação com BrdU, os resultados expressos na figura 13 evidenciam que comparativamente ao controlo, só foram observados valores significativamente mais elevados nos dias 2, 4, 6 e 8 após a indução de lesão. De salientar ainda que o valor de

densidade óptica obtido no sexto dia é ainda significativamente superior aos observados imediatamente, oito, dez, doze, catorze, dezasseis, dezoito e vinte dias após a lesão.

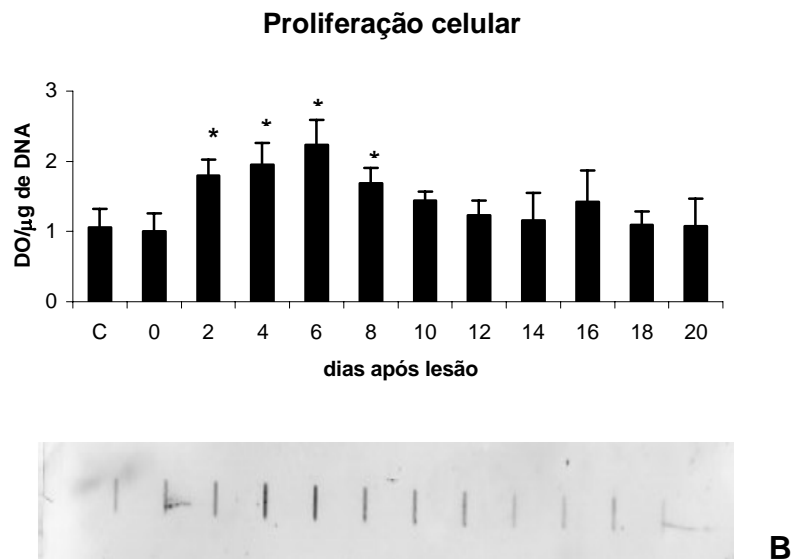


Figura 13 A) Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão de densidade óptica referente a células marcadas com BrdU e relativos ao grupo controlo (C) e aos vários subgrupos experimentais em função dos dias após lesão. B) Filme representativo do Western blotting para os diferentes momentos em que foram sacrificados os animais.

* P<0,05 vs controlo

A.2. Resultados referentes à análise morfológica

Avaliação da proliferação celular por imunohistoquímica

Na figura 14 é evidente a ausência de marcação nuclear no corte histológico não tratado com o anticorpo primário anti-BrdU, e como tal, funcionando como controlo negativo. Pelo contrário, nos controlos positivos, verificou-se uma marcação acentuada de núcleos de espermatogónias e espermatócitos nos cortes dos túbulos seminíferos (figura 15).



Figura 14 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU e sacrificado aos 2 dias após lesão. A preparação não foi sujeita ao anticorpo primário (controlo negativo), razão pela qual é observada a ausência de marcação de mionúcleos ou de núcleos intersticiais (ampliação original 625x).

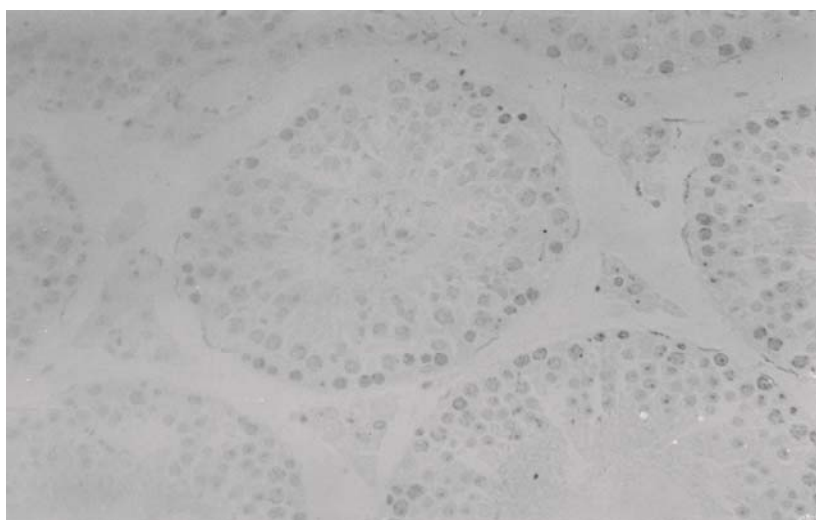


Figura 15 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal de túbulos seminíferos de um animal do grupo controlo injectado com 50 mg de BrdU (controlo positivo), onde é observada a incorporação deste composto em núcleos de espermatogónias e espermatócitos (ampliação original 375x).

Quatro dias após a indução de lesão foi notória a presença de núcleos marcados em posição central (figura 16) resultantes da fusão de mioblastos entre si ou com a fibra muscular adjacente. Adicionalmente, observou-se a presença de núcleos que

incorporaram a BrdU na periferia das fibras musculares maduras, correspondendo a células satélite, aparentemente em proliferação. Os núcleos de células que não se encontravam em fase S do ciclo celular não incorporaram a BrdU, como foi verificado na figura 16, pela presença de dois capilares sem qualquer tipo de marcação.



Figura 16 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, sacrificado quatro dias após a indução de lesão muscular. É observada a incorporação de BrdU por três mionúcleos em posição central, por um núcleo de uma célula satélite e por um núcleo de uma célula endotelial. É ainda notória a presença de dois capilares sem qualquer marcação nuclear (ampliação original 2500x).

Através da observação das figuras 17 e 18, verificou-se, como seria de esperar, que na fase activa do processo de reparação muscular, as células em proliferação não se restringiram apenas a células satélite, mas também a células intersticiais de origem endotelial e não endotelial.



Figura 17 Fotografia de microscopia óptica de um corte transversal do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU e sacrificado seis dias após lesão muscular. É notória a marcação acentuada de núcleos, quer de células intersticiais, endoteliais e não endoteliais, quer de células satélite (ampliação original 625x).

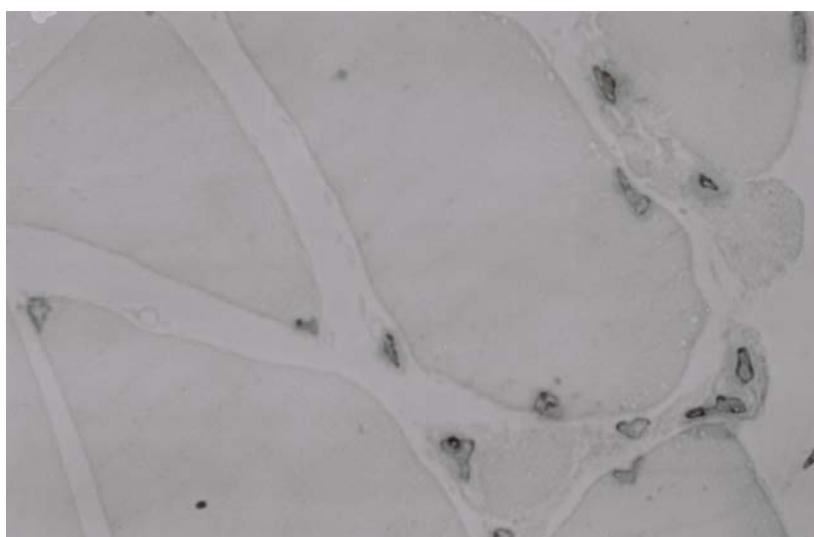


Figura 18 Fotografia de microscopia óptica de um corte oblíquo do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, e sacrificado aos doze dias após a indução de lesão muscular. É evidente a incorporação de BrdU por células satélite e por células intersticiais de origem endotelial e, aparentemente, fibroblástica (ampliação original 2500x)

No final do processo regenerativo, verificou-se que para além da quantidade de núcleos marcados ser escassa, se restringia praticamente a células de origem endotelial (figura 19).



Figura 19 Fotografia de microscopia óptica de um corte oblíquo do músculo *gastrocnemius* de um animal do grupo experimental, injectado com 50 mg de BrdU, e sacrificado aos vinte dias após a indução de lesão muscular. É evidente a incorporação de BrdU apenas na célula endotelial (ampliação original 2500x).

Na tabela 5 pode observar-se a percentagem de contribuição dos núcleos das células endoteliais, das células intersticiais, das células satélite e dos núcleos em posição central para a totalidade dos núcleos que incorporam BrdU, ao longo do protocolo experimental. Como se pode constatar, a percentagem de núcleos marcados de origem endotelial encontrou-se elevada no grupo controlo, decresceu nas fases iniciais do processo regenerativo e aumentou de forma gradual a partir do 8º dia, atingindo valores próximos do grupo controlo nas etapas finais do estudo, i.e., no 20º dia após a indução de lesão. Relativamente aos núcleos marcados de células de origem intersticial não endotelial, de que são exemplo os fibroblastos e os leucócitos, verificámos que a sua percentagem aumentou acentuadamente no início do processo regenerativo, atingindo um valor máximo de 30,2% ($\pm 3,66$) ao 6º dia após a indução de lesão, começando a diminuir a partir de então, até atingir um valor idêntico ao do grupo controlo na fase final do protocolo experimental. A percentagem de células satélite que incorporaram BrdU aumentou a partir do 2º dia e atingiu um valor máximo de 24,5% ($\pm 3,50$) 4 dias após a indução de lesão. Do 6º dia pós trauma em diante, verificou-se um decréscimo de CS marcadas, embora de forma oscilatória, tendo atingido uma percentagem semelhante à do grupo controlo no 20º dia do processo regenerativo. Em adição, observou-se um notório incremento da percentagem de núcleos marcados em posição central a partir do 4º dia, atingindo um pico máximo aos 8 dias pós lesão, momento a partir do qual ocorreu

uma diminuição bastante acentuada atingindo valores iguais ao do grupo controlo no final do estudo.

Tabela 5 - valores médios±desvios padrão (DP) da percentagem de núcleos com origem endotelial, intersticial não endotelial, nas células satélite e em posição central nas fibras musculares, relativamente à totalidade de núcleos marcados com BrdU, nos animais do grupo controlo e do grupo experimental nos diferentes momentos de avaliação após a indução de lesão

Grupos	% de núcleos marcados			
	Células Endoteliais	Células Intersticiais	Células Satélite	Núcleos Centrais
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Controlo	71,5±7,27	11,2±5,34	9,6±5,70	7,7±3,13
0 dias	70,8±6,24	12,1±5,93	9,9±4,35	7,2±5,93
2 dias	46,0±7,57 *	26,6±6,46 *	19,2±3,56 *	8,3±2,93
4 dias	40,3±5,45 *	24,3±4,77 *	24,5±3,50 *	10,9±2,88
6 dias	37,9±8,20 *	30,2±3,66 *	18,5±3,33 *	13,5±3,5
8 dias	44,3±8,83 *	20,3±6,48	19,2±1,98 *	16,1±3,41 *
10 dias	58,9±8,13	21,9±9,05	13,1±5,31	6,0±4,17
12 dias	61,3±12,02	14,4±8,46	15,7±9,94	8,6±7,79
14 dias	58,3±8,45	14,3±5,50	16,8±12,17	11,4±7,63
16 dias	69,6±9,75	10,5±7,18	12,3±9,41	8,6±8,14
18 dias	67,8±11,02	9,5±7,11	16,9±6,28	5,9±8,40
20 dias	69,2±14,95	11,5±9,52	11,5±7,60	7,7±6,55

* p<0,05 vs controlo

Foi efectuada a correlação entre os núcleos marcados por imunohistoquímica (nº de núcleos totais, nº de núcleos endoteliais, nº de núcleos de CS, nº de núcleos em posição central) e os respectivos valores de densidade óptica (DO) obtidos por análise bioquímica. Como se pode observar na figura 20, o número de núcleos totais que incorporaram a BrdU correlacionaram-se de forma positiva com os valores de DO obtidos por *South Western*, tendo-se obtido um coeficiente de correlação de *Pearson* de 0,968 (p<0,05). Os coeficientes de correlação encontrados entre o nº total de núcleos marcados, de CS, de células endoteliais, e em posição central, e os respectivos valores de DO obtidos por análise bioquímica, foram de 0.968, 0.8958, 0.9181 e de 0.673, respectivamente.

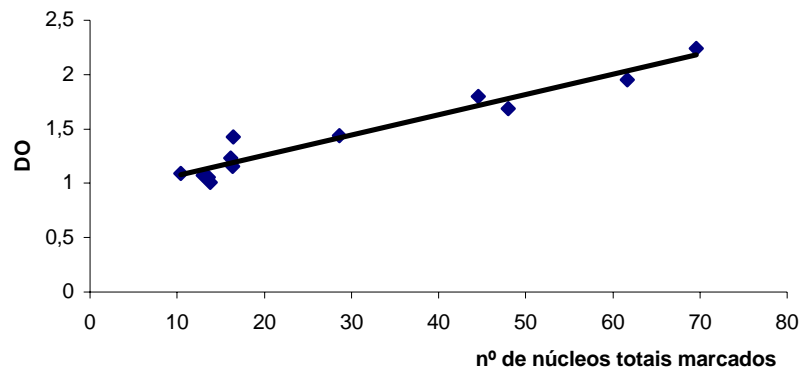


Figura 20 Recta de regressão linear entre núcleos totais marcados obtidos por imunohistoquímica e valores de densidade óptica obtidos pela técnica de *South Western*

Avaliação das alterações morfológicas por microscopia electrónica

Os cortes histológicos dos músculos de animais controlo apresentaram uma situação de normalidade morfológica, não sendo evidentes alterações no padrão estriado das fibras nem a presença de áreas de necrose (figura 21).

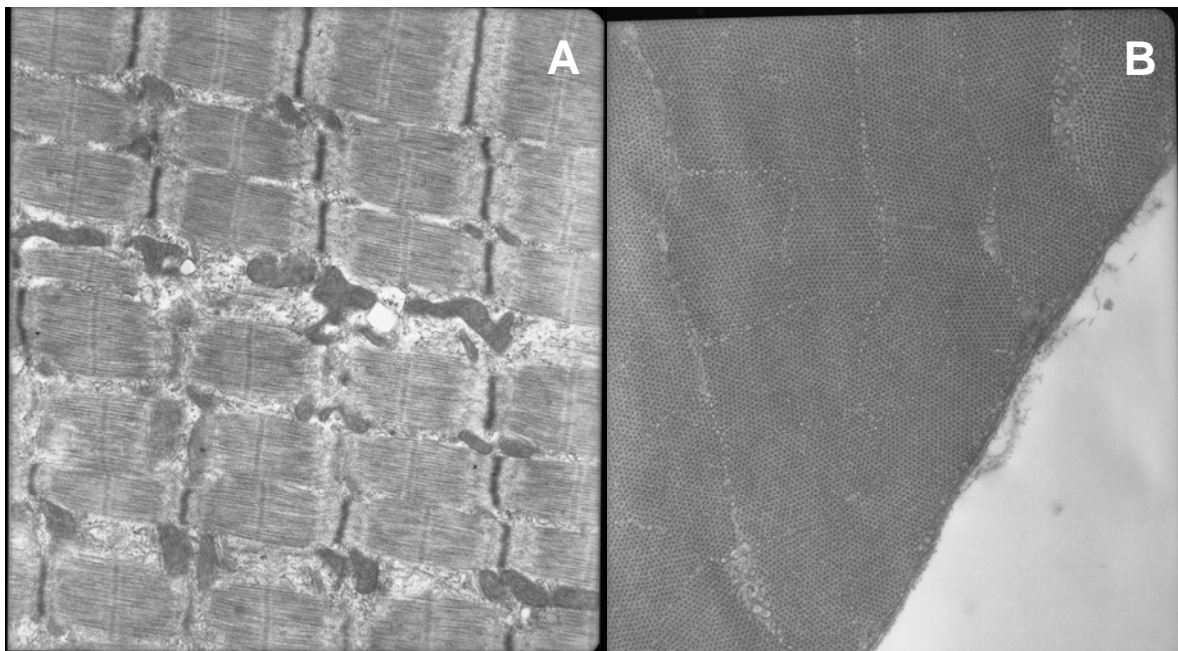


Figura 21 Fotografias de microscopia electrónica de um corte longitudinal (A) e transversal (B) do músculo gastrocnemius de dois animais controlo, evidenciando uma estrutura tecidual normal (ampliação original A: 12.500x; B: 20.000x).

No grupo experimental, a análise ultra-estrutural efectuada imediatamente após a indução de lesão (0 dias), revelou perda de continuidade da membrana celular, com conseqüente edema intracelular, e perda de organização miofibrilar. Os organelos celulares, em particular as mitocôndrias, permaneceram intactos não evidenciando sinais de *swelling* (figura 22A). Logo após a lesão, foi ainda possível observar perda de continuidade dos capilares, zonas de hemorragia e presença de eritrócitos no espaço intersticial. Os capilares quando não apresentavam perda de continuidade, exibiam acentuada vacuolização.

Dois dias após a indução de lesão a desorganização miofibrilar foi ainda mais evidente, sendo notória na área de traumatismo, a aglutinação de proteínas contrácteis. Nesta fase do processo regenerativo foram já observados o *swelling* mitocondrial (figura 22B) e a dilatação do retículo sarcoplasmático, com formação de vesículas, para além de grandes zonas de edema intracelular. Também a invasão tecidual de leucócitos, quer no interstício quer no interior de fibras lesadas, foi evidente a partir do 2º dia pós lesão (figura 23A), tendo-se verificado um decréscimo do seu número com o tempo, relacionado com a presença de detritos celulares no espaço intersticial. Foram também visualizadas células satélite com francos sinais de activação.

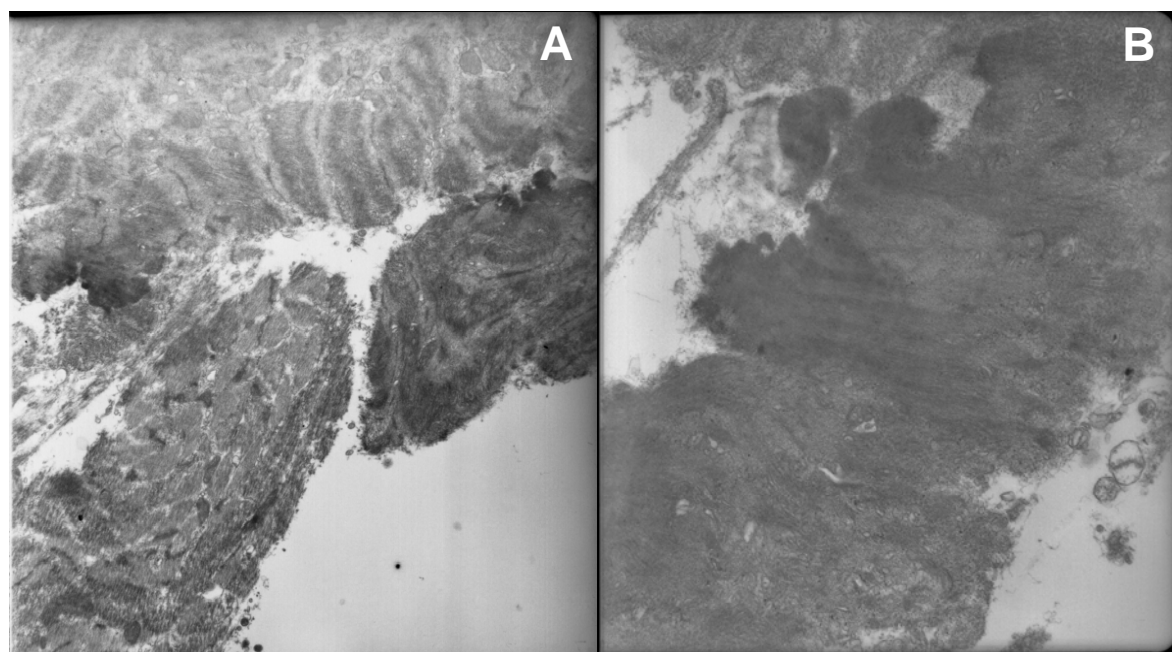


Figura 22 Fotografias de microscopia electrónica de cortes longitudinais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado às zero horas (**A**) e de outro aos dois dias (**B**) após a indução de lesão. É notória a perda de continuidade do sarcolema, a desorganização miofibrilar e o edema intracelular (**A**). Em **B** é evidente a perda de organização miofibrilar, por desnaturação proteica, o *swelling* mitocondrial, assim como a existência de grandes áreas de edema intracelular (ampliação original **A**: 8.000x; **B**: 20.000x).

Na zona de impacto, a perda de continuidade do sarcolema ou da membrana das células endoteliais, permitiu a libertação de alguns organelos para o espaço intersticial, como se pode observar na figura 23B.

Quatro dias após a indução de lesão, o número de mitocôndrias em *swelling* tornou-se acentuado (figura 23B). Nesta fase do processo regenerativo, vários sinais de regeneração muscular tornaram-se evidentes. As células satélite activas que começaram a ser detectadas dois dias pós lesão, aumentaram em número, e começaram a ser visualizados núcleos em posição central. Na figura 24 A e B é evidente a presença de núcleos centrais, com nucléolos proeminentes sugestivos de uma intensa síntese proteica.

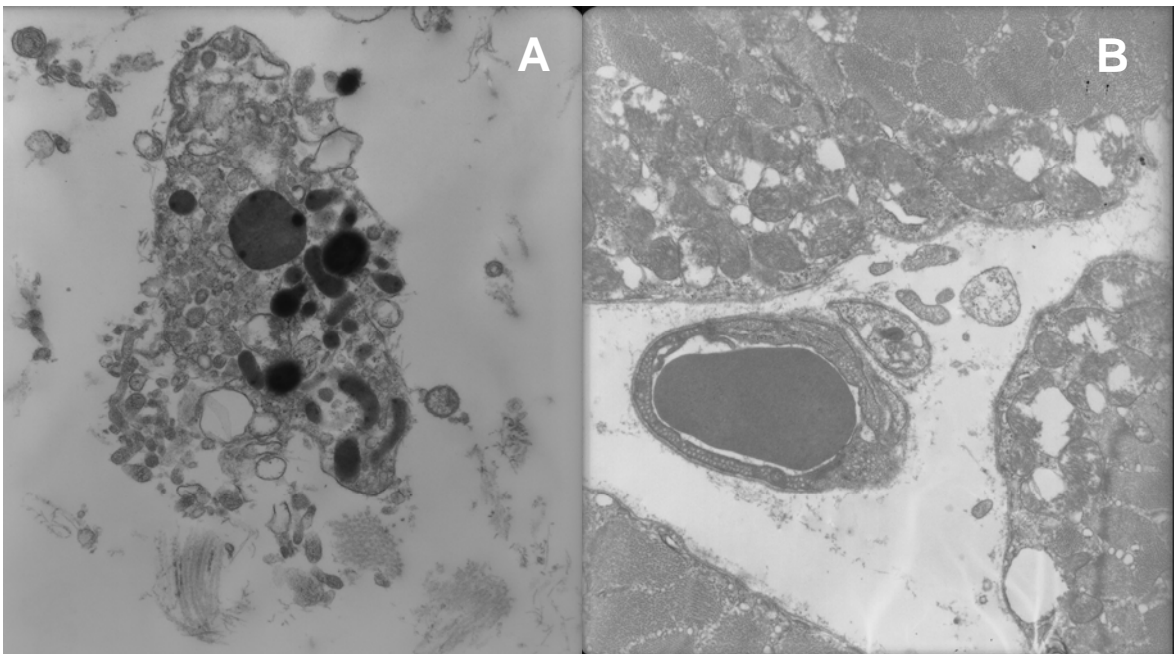


Figura 23 Fotografias de microscopia electrónica de cortes transversais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos quatro dias após a indução de lesão. Em **A** pode ser observado um fagócito e em **B** é evidente a existência de organelos e material intracelular no espaço intersticial assim como a existência de *swelling* mitocondrial e de um ligeiro edema intracelular difuso (ampliação original **A**: 16.000x; **B**: 10.000x).

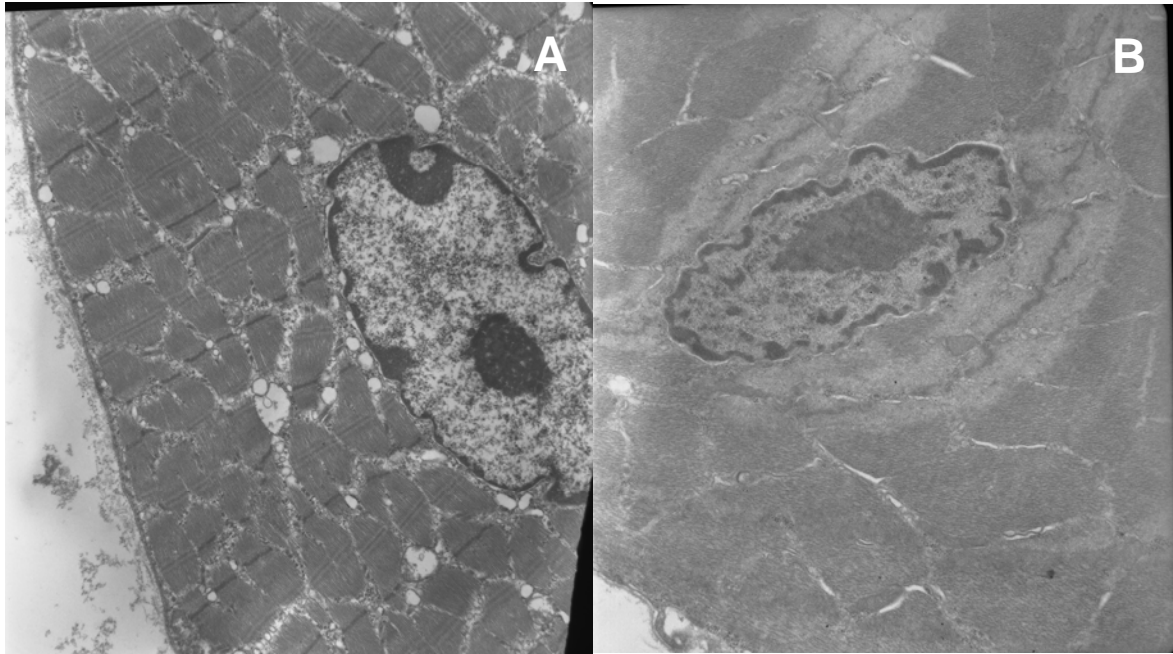


Figura 24 Fotografias de microscopia electrónica de cortes transversais do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos quatro dias (**A**) e de outro aos seis dias (**B**) após a indução de lesão. Nas duas fotografias são notórios núcleos centrais com evidentes nucléolos, sugestivos de um intensa síntese proteica, e um ligeiro edema intracelular (ampliação original **A**: 8.000x; **B**: 12.500x).

Embora os fibroblastos começassem a proliferar nas fases iniciais do processo regenerativo (cerca de dois a quatro dias pós lesão), a síntese de fibras de colagénio só se tornou evidente em fases mais adiantadas do referido processo. Como se pode verificar pela análise da figura 26 A e B, doze dias após a indução de lesão foi evidente a presença de uma quantidade elevada de fibras de colagénio no espaço intersticial.

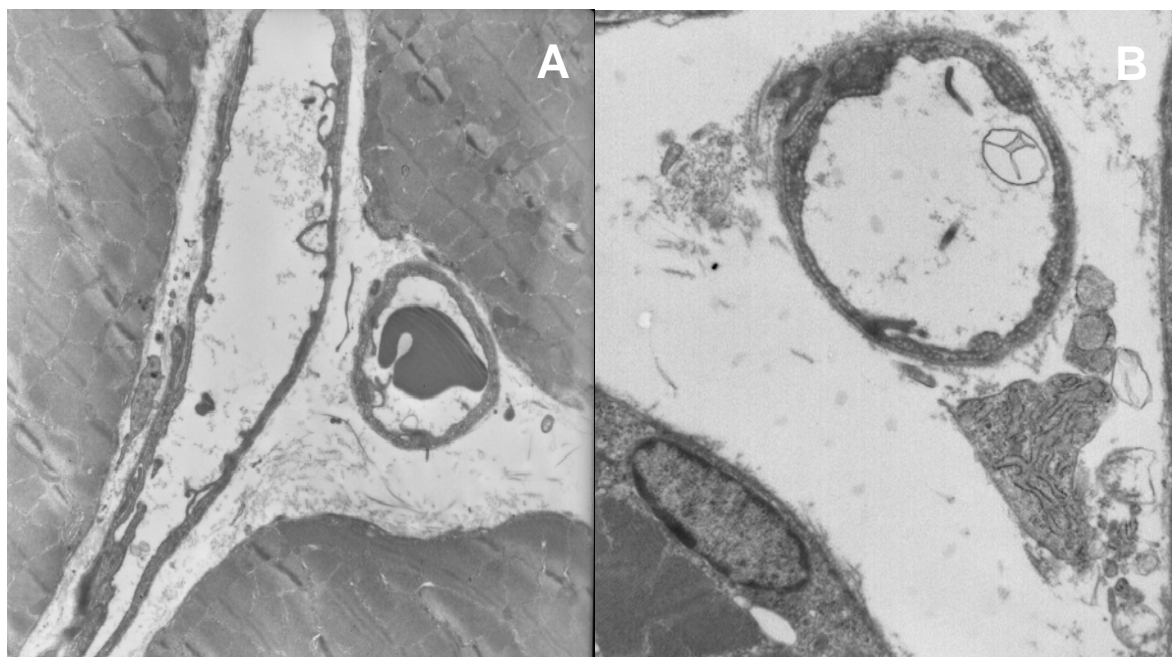


Figura 25 Fotografias de microscopia electrónica de um corte oblíquo (**A**) e de um corte transversal (**B**) do músculo *gastrocnemius* de um animal sacrificado aos doze dias (**A**) e de outro aos dezasseis dias (**B**) após a indução de lesão. Nas duas fotografias é evidente a presença de grande quantidade de fibras de colagénio e a presença de um fibroblasto activo em **B** (ampliação original **A**: 5.000x; **B**: 12.500x).

3.4. Discussão

Na literatura estão descritos vários modelos de indução de lesão (Lefaucheur e Sebillé 1995; Rushton *et al.* 1997; McLoon *et al.* 1998; Rantanen *et al.* 1999) com o propósito de estudar a evolução do processo regenerativo no tecido muscular esquelético. Muitos destes protocolos experimentais, utilizados com o desígnio de danificar células musculares, apresentam algumas limitações tais como, a existência de repercussões sistémicas, no caso particular da injeção de substâncias tóxicas, ou de não permitirem o restabelecimento das propriedades funcionais do músculo danificado, como acontece nos transplantes musculares (Carlson 2003). Assim sendo, dadas as limitações inerentes a alguns destes modelos experimentais, propusemo-nos estudar o processo regenerativo ao longo de um período de 20 dias, recorrendo ao modelo de trauma directo (Beiner *et al.* 1999; Minamoto *et al.* 1999; Minamoto *et al.* 2001; Farges *et al.* 2002; Wright-Carpenter *et al.* 2004) sobre a superfície cutânea do músculo *gastrocnemius*. A nossa escolha recaiu neste modelo experimental principalmente por ser de fácil execução, por a sua reprodutibilidade ter sido já demonstrada em vários estudos experimentais (Crisco *et al.* 1994; Beiner *et al.* 1999), e pelo facto do seu efeito ser principalmente local. É ainda de salientar que as contusões são frequentemente associadas a práticas desportivas (Minamoto *et al.* 1999) e, como tal, o estudo do processo regenerativo com recurso a este modelo experimental poderá ter alguma aplicabilidade.

A eficácia da agressão ao músculo esquelético desencadeada por este protocolo foi confirmada pelas alterações estruturais observadas por microscopia electrónica. Efectivamente, logo após a indução de lesão, pudemos observar uma perda de continuidade do sarcolema, presença de uma hemorragia infiltrativa com eritrócitos no espaço intersticial, e edema intracelular, contrastando com o padrão morfológico de normalidade apresentado pelo grupo controlo. Embora imediatamente após a lesão se possa verificar a presença de zonas de edema intracelular, em particular na proximidade da membrana danificada, os organelos, com destaque para as mitocôndrias, permaneceram intactos e não evidenciaram sinais de *swelling*. Nesta fase, foi ainda visível uma desorganização miofibrilar na zona de impacto. Esta apreciação qualitativa geral das alterações morfológicas nas fibras musculares danificadas foi de encontro às descritas em outros estudos experimentais que recorreram a distintos modelos de indução de lesão no músculo esquelético, nomeadamente o exercício físico excêntrico, (Friden e Lieber 1998; Stupka *et al.* 2001), o esmagamento da fibra (Crisco *et al.* 1994) e

a injeção de toxinas (Devor e Faulkner 1999). Huard *et al.* (2002) referem que o trauma mecânico subjacente ao experimentado em alguns modelos de lesão, como por exemplo, o que foi aplicado ao presente estudo, danifica a integridade da membrana plasmática e da lâmina basal, permitindo o influxo de cálcio para o interior da fibra muscular, com repercussões deletérias na viabilidade celular. De facto, os fenómenos de degeneração intrínseca observados logo após a indução de lesão por esmagamento poderão ser explicados, pelo menos em parte, pela perda de homeostasia ao ião cálcio, dado que o aumento da concentração intracelular deste ião pode desencadear diversos processos de degradação a nível celular, entre os quais se destaca a activação das calpaínas e da fosfolipase A₂ (Armstrong *et al.* 1991; Jackson 1992).

De facto, no nosso estudo, pudemos observar o pico máximo da actividade das calpaínas, 2 dias após a indução de lesão. Uma vez que estas proteases danificam uma grande quantidade de proteínas miofibrilares e do citoesqueleto (Ebbeling e Clarkson 1989; Saido *et al.* 1994; Goli *et al.* 2002), algumas das alterações qualitativas por nós observadas, através da microscopia electrónica, como a perda de organização das miofibrilas, com disrupção das linhas Z e extensão do seu material para as bandas I adjacentes, poderão ser consequência da activação destas proteases. Igualmente, Magaudo *et al.* (2004) referiram que as maiores alterações estruturais musculares resultantes da execução de exercício físico, estavam sobretudo centradas nas linhas Z. Adicionalmente, ao aumento de actividade desta protease neutra nas fases iniciais do nosso protocolo experimental, verificamos ainda, que as calpaínas decrescem acentuadamente de actividade após o 4º dia do processo regenerativo, voltando a aumentar a sua actividade a partir do 10º dia. Este incremento, observado nas fases mais avançadas do processo de regeneração muscular, poderá estar associado com a fusão dos mioblastos de forma a originar miotúbulos, visto que as calpaínas, sobretudo a m-calpaína, parecem desempenhar um papel importante na reorganização do citoesqueleto durante o processo de diferenciação mioblástica (Barnoy *et al.* 1996; Sorimachi *et al.* 1997; Belcastro *et al.* 1998).

Dois e quatro dias após a indução de lesão, foi observado, por microscopia electrónica, *swelling* mitocôndrial. A presença de uma elevada concentração do ião cálcio no sarcoplasma poderá estar, igualmente, relacionado com estas alterações estruturais observadas nestes organelos celulares (figura 22B). De facto, com o incremento das concentrações do cálcio no citoplasma, é activada a função de tamponamento da

mitocôndria, de forma a manter a homeostasia celular esquelética (Armstrong *et al.* 1991; Duarte *et al.* 1992). Este processo poderá resultar, não só no *swelling* mitocondrial, mas também numa diminuição da síntese de ATP, tornando crítica a funcionalidade de todas as ATPases existentes nas membranas celulares (Ebbeling e Clarkson 1989; Armstrong *et al.* 1991).

Nesta fase inicial do nosso estudo, i.e., dois a quatro dias após a indução de lesão, foi também observado um incremento acentuado da actividade da NAG, uma importante enzima existente nos lisossomas das fibras musculares. De facto, a degradação proteica observada após um estímulo lesivo, tem sido atribuída não só a proteases não lisossómicas como as calpaínas, mas também a enzimas lisossómicas (Armstrong *et al.* 1991). Em vários estudos experimentais utilizando como estímulo lesivo o exercício físico, foi observado um aumento da actividade de várias hidrolases acidas, tais como a catepsina C (Salminen 1985), a β -glucuronidase e a NAG (Vihko *et al.* 1978). O aumento da actividade das várias enzimas do sistema lisossomal muscular coincide temporalmente com os sinais histológicos indicadores, quer da resposta autofágica das fibras quer da resposta heterofágica de células inflamatórias (Duarte 1989).

O processo de degeneração extrínseca, mediado pela invasão leucocitária dos músculos agredidos, é caracterizado pela elevada actividade fagocítica, pela libertação de enzimas proteolíticas e pela produção acrescida de EROs; a par da estimulação dos processos regenerativos, tem sido sugerido como contribuindo marcadamente para o exacerbar do processo catabólico (Armstrong *et al.* 1991; Pizza *et al.* 2002). Efectivamente, pudemos observar que as alterações estruturais mais marcantes nos 2^o e 4^o dias após a indução de lesão se relacionaram com o aumento significativo da actividade de marcadores leucocitários, como a MPO. Pela análise dos nossos resultados verificámos que a actividade da MPO, embora já apresente valores elevados no 2^o dia após lesão, é máxima apenas por volta dos 4 dias pós contusão. Dado a MPO se encontrar sobretudo armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (Hampton *et al.* 1998; Arnhold 2004) e este tipo de células polimorfonucleares serem as 1^{as} a invadir o tecido danificado (Lapointe *et al.* 2002; Pizza *et al.* 2002; Lokuta *et al.* 2003), seria de esperar que o valor máximo de actividade desta peroxidase surgisse mais cedo. De facto, alguns estudos experimentais (Gleeson *et al.* 1995; Pizza *et al.* 2001) demonstraram que a invasão de neutrófilos se inicia dentro de 2 a 6 horas após a lesão e que a concentração destas células inflamatórias se mantém em valores acima do normal durante pelo menos 48

horas. O facto da actividade da MPO, no nosso protocolo experimental, apresentar o valor máximo mais tarde do que seria de esperar, poderá estar relacionado com a intensidade e severidade da lesão induzida. Efectivamente, na literatura está descrito que este tipo de estímulo contusivo e não invasivo danifica de forma acentuada o sarcolema, a lâmina basal e as estruturas vasculares e nervosas do músculo afectado (MacGregor e Parkhouse 1996). Assim sendo, a libertação de factores quimiotáticos, quer pela fibra lesada, quer pela matriz celular lesada, poderiam atrair durante mais tempo este tipo de leucócitos polimorfonucleares. Outra explicação para os resultados encontrados, prende-se com o facto de a MPO existir também nos grânulos dos monócitos/macrófagos, embora em muito menor quantidade do que nos neutrófilos (Arnhold 2004). Uma vez que este tipo de células mononucleares surge em fases mais tardias do processo inflamatório, poderia contribuir, mesmo que de uma forma pouco acentuada, para o aumento da actividade desta enzima.

Outro aspecto que se destaca da análise comportamental da MPO ao longo do processo regenerativo é o aumento da actividade que se verifica na fase final deste estudo, i.e., 20 dias após a indução da lesão. Uma das possíveis explicações para este incremento da actividade da MPO poderá resultar da invasão de neutrófilos para remover algumas CS ou outras delas derivadas que sofreram degeneração ao fim de alguns ciclos de proliferação. No entanto, pelo menos do nosso conhecimento, não existe literatura disponível que suporte estas suposições relativamente à actividade da MPO na fase final do processo regenerativo. Também através da observação das preparações histológicas, não nos foi possível detectar a presença deste tipo de células sanguíneas.

O aumento da actividade da NAG observado nos 2 e 4 dias após lesão, para além de ser atribuído ao sistema lisossomal das fibras musculares, resulta também da infiltração de células fagocíticas durante a resposta inflamatória. Uma vez que esta enzima lisossómica se encontra também presente nas células inflamatórias, este aumento de actividade da NAG poderá igualmente reflectir a infiltração de células fagocíticas, nomeadamente de neutrófilos e de macrófagos para o interior dos tecidos lesados. Estas células inflamatórias, ao fagocitarem os detritos celulares das fibras musculares lesadas, contribuem significativamente para uma degeneração adicional do referido tecido. De facto, a par da estimulação do processo regenerativo, durante o processo fagocítico os neutrófilos e os macrófagos libertam substâncias com grande potencial lesivo, como sejam diversas enzimas proteolíticas e espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio, contribuindo para o exacerbar do catabolismo proteico e da lesão muscular esquelética

observada durante os primeiros dias pós lesão (Child *et al.* 1999; Pizza *et al.* 2001; Pizza *et al.* 2002; Tidball 2005). Desta forma, as alterações morfológicas observadas no nosso trabalho experimental durante o período de invasão leucocitária poderão reflectir, em parte, o papel desempenhado por estas células fagocíticas no processo de degeneração tecidual. Efectivamente, através da análise qualitativa obtida por microscopia electrónica, verificámos que dois dias após a indução de lesão, as fibras musculares começam a ser invadidas por fagócitos que por sua vez, aumentaram em número quatro dias após a indução de lesão. A desorganização miofibrilar e desnaturação de proteínas contrácteis, bem como o intenso edema intracelular são aspectos bem evidentes no segundo e quarto dias após a lesão.

Vários estudos referem que nestas circunstâncias de lesão muscular, os macrófagos tornam-se predominantes 1 a 3 dias após a lesão e que, para além de fagocitarem as fibras necrosadas, libertam diversas citocinas e factores de crescimento que têm um papel determinante na activação das CS e de outras células *stem* musculares (Keller *et al.* 1999; Seale e Rudnicki 2000; Hawke e Garry 2001; Morgan e Partridge 2003). Pela análise dos nossos resultados, recorrendo à metodologia de *South Western*, verificámos que as CS e outras células que no momento se encontrem em proliferação tais como, células intericiais de origem endotelial e não endotelial, apresentam o seu pico máximo de actividade entre o 4º e o 6º dia pós lesão. Assim, como foi referido no capítulo anterior, esta metodologia fornece-nos apenas informação da quantidade total de células marcadas, e não especificamente de células satélite.

De acordo com Goetsch *et al.* (2003), as células precursoras miogénicas proliferam extensivamente nos 2 a 4 dias após lesão induzida com cardiotoxina, formando estruturas ao redor das miofibras lesadas e necrosadas. No mesmo sentido, Hurme e Kalimo (1992) referem que as CS são mais numerosas no 2º e 3º dia após contusão. De facto, os resultados obtidos pela imunohistoquímica são suportados pela literatura consultada, uma vez que a percentagem de núcleos de células satélite marcados aumenta a partir do 2º dia e apresenta um pico máximo aos 4 dias pós lesão, diminuindo a partir desse momento. Estas células precursoras miogénicas, após proliferação, abandonam o ciclo celular e fundem-se, originando miotúbulos imaturos ou zonas de fibras musculares com núcleos em posição central (Wright-Carpenter *et al.* 2004). Através da análise morfológica quantitativa efectuada, verificámos que a percentagem de núcleos marcados em posição central começa a aumentar 4 dias após a lesão e atingem o seu valor máximo ao 8º dia pós trauma (tabela 5). Também a análise qualitativa efectuada por

microscopia electrónica, evidencia a presença de núcleos centrais a partir do 4º dia pós lesão, como se pode verificar pela figura 16 e 24, respectivamente. De facto, Chambers e McDermott (1996) referem que os primeiros miotubulos começam a surgir 3 a 4 dias após lesão e que o seu número aumenta até ao décimo dia, vindo de encontro aos resultados obtidos no nosso estudo.

Os factores de crescimento e outros mediadores libertados durante o processo de degeneração muscular, para além serem mitogénicos para as CS, são-no também para outros tipos celulares. De facto, os resultados obtidos por imunohistoquímica mostram que a percentagem de núcleos marcados das células intersticiais de origem não endotelial, provavelmente fibroblastos, aumenta a partir do 2º dia, e apresenta o seu valor máximo 6 dias após a lesão. A presença de grandes quantidades de fibras de colagénio no espaço intersticial, como se pode observar na figura 25, resultante da activação dos fibroblastos, começa apenas a ser observada nas fases mais adiantadas do processo regenerativo. De forma idêntica, por microscopia óptica foi observado um número elevado de células intersticiais, aparentemente fibroblastos, doze dias após a indução de lesão. Na fase final do processo regenerativo considerado no nosso estudo, verificámos um reduzido número de núcleos marcados, restringindo-se praticamente a células de origem endotelial. Também no grupo controlo, os núcleos marcados eram sobretudo de origem endotelial.

Convém ainda salientar que, toda a análise qualitativa e quantitativa efectuada por microscopia óptica foi efectuada nas zonas adjacentes à área lesada, uma vez que nas zonas necrosadas não são visíveis de forma clara, os núcleos marcados. Importa ainda referir que na análise quantitativa efectuada, a contagem do número de núcleos marcados foi contabilizado por 100 fibras.

A elevada correlação encontrada entre o número total de núcleos marcados por imunohistoquímica, e a densidade óptica obtida por *South Western* vem reforçar a utilização desta ultima metodologia na marcação da totalidade de células em proliferação. De facto, quando se efectuou a correlação entre os valores de densidade óptica e os núcleos discriminados de células satélite de fibras musculares em posição central e de células endoteliais, os valores de correlação foram, como seria de esperar, mais baixos.

Durante o processo de regeneração muscular é possível que, adicionalmente aos fenómenos anteriormente discutidos, ocorra também apoptose de células que após terem desempenhado a sua função não sejam mais necessárias, ou de células que após lesão tenham sido reparadas de forma inadequada (Dee *et al.* 2002). De facto, no nosso estudo verificámos um aumento acentuado da actividade da caspase-3 nos 2º e 4º dias após a lesão. Este aumento da actividade desta protease nas fases iniciais do processo regenerativo poderá estar relacionado com a indução do processo apoptótico de células inflamatórias. Uma vez que nos 2 e 4 dias pós lesão o tecido muscular se encontra invadido por fagócitos e que a presença massiva deste tipo de células pode ser prejudicial para que os mioblastos prossigam o programa de diferenciação muscular, então a eliminação destas células inflamatórias poderá ser fundamental para que a regeneração muscular se processe com normalidade. Neste sentido, Sandri *et al.* (2001) referem que a persistência de células inflamatórias no tecido muscular pode ser crítica para a viabilidade das miofibras. Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que os macrófagos induzem a apoptose dos neutrófilos contribuindo para a resolução da resposta inflamatória inicial (Meszaros *et al.* 2000). Também com recurso a estudos *in vitro*, Sandri *et al.* (2001) mostraram claramente que os macrófagos sofrem apoptose espontânea e que a presença de mioblastos aumenta o processo apoptótico mediado pela ligação do ligando Fas (FasL) ao seu receptor Fas. Desta forma, o aumento da actividade de caspase-3 observada no nosso estudo, nos primeiros dias do processo regenerativo poderá ter sido, pelo menos parcialmente, mediado pela via extrínseca da apoptose, ou seja pela ligação do FasL ao “receptor de morte” Fas. Dado que as células inflamatórias, de uma forma geral, expressam o “receptor de morte” Fas (Brown e Savill 1999) e que, quer os macrófagos quer os mioblastos expressam o ligando Fas (Brown e Savill 1999; Sandri *et al.* 2001), a apoptose das células inflamatórias poderá ser iniciada pela ligação do ligando ao respectivo receptor. Uma vez iniciada a via extrínseca, a pró-caspase-8 é sequestrada para a membrana celular, através da proteína adaptadora FADD (Fas associated death domain), e esta ligação promove um recrutamento adicional de mais moléculas desta pró-caspase e a sua subsequente activação. Uma vez activada, a caspase-8 pode clivar a caspase-3 a qual é posteriormente translocada para o núcleo induzindo as alterações morfológicas inerentes ao processo apoptótico (Primeau *et al.* 2002; Adhietty e Hood 2003; Lawen 2003). Desta forma, a interacção do ligando Fas com o seu receptor localizado na célula alvo estimula uma cascata de eventos intracelulares levando à indução da apoptose (Kiener *et al.* 1997). Assim sendo, e de acordo com o que vem descrito na literatura, o aumento inicial da actividade da caspase-

3 observado no nosso estudo, poderá estar relacionado com a apoptose de células inflamatórias, nomeadamente de neutrófilos e de macrófagos.

Adicionalmente ao aumento inicial da actividade da caspase-3, verificou-se ainda, na fase final do nosso estudo, um incremento, embora não tão acentuado, da actividade desta enzima. Este aumento parece ocorrer após a fase de maior proliferação mioblástica, coincidindo, provavelmente, com o processo de diferenciação muscular. No entanto, dada a escassez de estudos, pelo menos do nosso conhecimento, que analisem marcadores apoptóticos durante um processo regenerativo após indução de lesão muscular esquelética, e de no nosso protocolo a determinação de parâmetros apoptóticos se ter efectuado no homogeneizado total de músculo, as nossas explicações são meramente especulativas. Assim sendo, o aumento da actividade da caspase-3, verificado a partir do 12º dia, poderá estar relacionado com a eliminação de mioblastos e/ou de fibroblastos que em número elevado após a fase de extensa proliferação por este tipo de células. De facto, Ruest *et al.* (2002a) ao verificarem que a expressão da caspase-3 surge em músculos adultos apenas durante o processo regenerativo, sugerem que esta enzima poderá ter um papel importante na eliminação de mioblastos em excesso durante o referido processo. Já anteriormente, Podhorska *et al.* (1998) tinham observado, com recurso à microscopia electrónica, a apoptose de CS após um protocolo de corrida com a duração de 16 horas, parecendo assim que este tipo de células miogénicas, quando em excesso, eram eliminados por um processo de morte celular programada. Também durante o desenvolvimento muscular, alguns estudos referem que os mioblastos que não conseguem abandonar o ciclo celular acabam por ser eliminados por apoptose (Kamradt *et al.* 2002). Em alternativa, Fernando *et al.* (2002) observaram que o processo de miogénese estava comprometido em ratos *Knockout* de caspase-3 e que a formação de miotúbulos foi drasticamente diminuída em culturas de mioblastos caspase 3^{-/-}, sugerindo que esta protease tem um papel importante no processo de diferenciação muscular. Adicionalmente, os mesmos autores verificaram, com recurso a linhas celulares de estirpes selvagens, que o aumento da actividade de caspase-3 ocorria após a iniciação da diferenciação muscular e que a marcação desta enzima por imunohistoquímica estava associada a mioblastos em diferenciação e não a células em apoptose. No mesmo sentido, Mogi e Togari (2003) demonstraram que a diferenciação osteoblástica requer a activação de varias caspases. Tendo em conta os factos anteriormente descritos, o aumento da caspase-3 na fase final do nosso estudo poderá estar relacionado com a eliminação de mioblastos presentes em número elevado após

divisão celular e/ou com o processo de diferenciação muscular, mediado pela activação da *mammalian sterile twenty-like kinase* (MST1) e da MAPK (Fernando *et al.* 2002).

Para além de analisarmos as variações de um indicador geral da apoptose, como é o caso da caspase-3, analisámos também as alterações na expressão de proteínas da família Bcl-2, visto estas proteínas desempenharem um papel importante na regulação da via intrínseca da apoptose. Pela análise dos resultados do nosso estudo verificámos que, nos diferentes momentos após a indução da lesão, a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 apresentaram comportamentos opostos, ou seja, quando a expressão da proteína Bax se encontra elevada a proteína Bcl-2 exhibe níveis baixos de expressão e vice-versa. No que diz respeito à expressão da proteína Bax, esta apresenta níveis elevados no 4º e 6º dias após indução de lesão o que poderá estar relacionado com a indução do processo apoptótico de células inflamatórias e de células endoteliais de vasos sanguíneos. Embora a maioria dos estudos (Kiener *et al.* 1997; Brown e Savill 1999; Sandri *et al.* 2001) efectuados refira que a apoptose das células inflamatórias ocorre através da ligação do ligando Fas ao seu receptor, i.e. pela via extrínseca da apoptose, Olivé e Ferrer (2000) detectaram forte imunoreactividade à proteína Bax nas células fagocíticas após 24 horas da injeção com metoclopramida. Assim sendo, a via mitocondrial, em adição à via extrínseca da apoptose, poderá também ter um papel importante na indução do processo de morte celular de células inflamatórias. Adicionalmente, o aumento dos níveis de Bax poderá também estar relacionado com a indução de apoptose de células endoteliais dos capilares musculares. Efectivamente, Podhorska-Okolwo *et al.* (1998) observaram apoptose de células endoteliais, evidenciada pela presença de cromatina compacta e de corpos apoptóticos, quatro dias após a realização de exercício físico. No nosso estudo, a proteína Bax apresentou valores elevados de expressão aos 4 e 6 dias pós lesão, podendo estar relacionados com fenómenos apoptóticos de células inflamatórias e, adicionalmente, de células endoteliais dos vasos sanguíneos. Nesta fase do processo regenerativo (4 e 6 dias pós lesão) a proteína Bcl-2 apresenta níveis de expressão muito abaixo dos verificados nos animais controlo, e consequentemente, a razão Bax/Bcl-2 apresenta um incremento sugestivo da ocorrência de fenómenos de morte celular programada.

Nas fases finais do nosso protocolo experimental, ou seja a partir do 12º dia pós lesão, os níveis de expressão da proteína Bax começaram a aumentar de forma crescente até, pelos menos, ao vigésimo dia. No que diz respeito à expressão da proteína Bcl-2,

verificámos que se passa exactamente o inverso, i.e., decresce a partir do décimo segundo dia. Na literatura por nós pesquisada, apenas um estudo analisa a expressão de proteínas da família do Bcl-2 por um período de 21 dias após a injeção de metoclopramida (Olive e Ferrer 2000). Neste estudo Olivé *et al.* (2000) observaram que as miofibras regeneradas, que começaram a surgir a partir do 4^o dia, mostravam um aumento moderado de imunoreactividade para a proteína Bax até ao 21^o dia e, em oposição, estas fibras musculares não apresentavam marcação para a proteína Bcl-2. Ao observarem, ainda, que as fibras musculares regeneradas não apresentavam características morfológicas típicas do processo apoptótico, os mesmos autores sugeriram que a expressão das proteínas pró-apoptóticas possa não ter qualquer relação com a indução de morte celular mas sim com o processo de regeneração muscular esquelética. No nosso estudo, verificámos um incremento bastante acentuado da proteína pró-apoptótica Bax na fase final do protocolo o que, de acordo com Olivé *et al.* (2000), parece sugerir a sua participação na regeneração muscular das fibras lesadas.

No nosso ponto de vista, parece-nos que esta área de investigação, englobando o estudo de fenómenos apoptóticos no decurso de um processo de regeneração muscular, está ainda pouco explorada e, como tal, serão necessários mais trabalhos experimentais para verificar qual o tipo de células que está, eventualmente, a sofrer apoptose e, também, para tentar desvendar o momento exacto em que esses fenómenos de morte celular programada ocorrem nos diferentes tipos celulares.

IV. Plasticidade muscular esquelética

4.1. Revisão da literatura

4.1.1. Heterogeneidade das fibras musculares

O músculo esquelético é composto por uma grande variedade de fibras com propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais específicas sendo, por isso, considerado como um tecido extremamente heterogéneo (Torgan e Daniels 2001). Esta diversidade de fibras musculares resulta do facto de muitas das proteínas miofibrilares, como é o caso das miosinas, poderem ser expressas sob várias isoformas (Pette 2002). No caso específico das isoformas das cadeias pesadas de miosina (MHCs), pelo facto de possuírem um local de ligação ao ATP, surgem como determinantes nas propriedades funcionais do músculo no qual elas são expressas, sendo frequentemente utilizadas como marcadores para delinear o tipo de fibra muscular (Bigard *et al.* 1996; Pette e Staron 2000; Baldwin e Haddad 2002).

No músculo esquelético de roedores adultos, pode-se encontrar quatro tipos distintos de fibras musculares com base na funcionalidade muscular, nomeadamente um tipo de fibras de contracção lenta, ou tipo I, e três tipos de fibras de contracção rápida ou tipo II (Sullivan *et al.* 1995; Pette e Staron 2000). As fibras de contracção lenta ou tipo I expressam a isoforma MHCI (ou MHC β) e, do ponto de vista funcional, possuem baixa actividade da ATPase apresentando, conseqüentemente, menor velocidade de encurtamento. Este tipo de fibra produz menor tensão específica em comparação com as fibras de contracção rápida sendo, no entanto, mais eficiente (Schiaffino e Reggiani 1996). No que diz respeito às características morfológicas, as fibras tipo I surgem com uma coloração vermelha resultante da alta concentração de mioglobina e da presença de um grande número de capilares, o que contribui para a sua elevada capacidade oxidativa (Scott *et al.* 2001; Spangenburg e Booth 2003). Relativamente às fibras de contracção rápida, estas podem ser subdivididas em fibras do tipo IIa, IIx/d e IIb, de acordo com a expressão das isoformas de MHC IIA, IIX/D e IIB, respectivamente. As fibras de contracção rápida degradam rapidamente o ATP, o que lhes confere uma maior velocidade de contracção muscular, sendo fundamentalmente mobilizadas nos movimentos rápidos durante os esforços de alta intensidade. Estas fibras são menos eficientes do que as fibras de contracção lenta, ocorrendo um maior gasto energético durante a execução de determinada função (Talmadge e Roy 1993). Em relação ao perfil metabólico, as fibras IIb e IIx/d utilizam essencialmente o metabolismo glicolítico, enquanto que as fibras IIa apresentam os dois tipos de metabolismo (oxidativo e glicolítico) (Hughes *et al.* 1999). Adicionalmente, durante o desenvolvimento muscular, pode-se observar a expressão das isoformas de MHC embrionária e neonatal (Lyons *et al.* 1990; Schiaffino e Reggiani 1996). Estas duas isoformas, características do período embrionário e fetal, surgem também no músculo adulto associadas aos processos de regeneração muscular (Allen *et al.* 2000).

Para além das fibras que contêm apenas uma das isoformas MHC, o músculo adulto apresenta ainda uma quantidade apreciável de fibras híbridas, caracterizadas pela co-expressão de duas ou mais isoformas de MHC (Andersen *et al.* 1999; Pette 2002; Rosser e Bandman 2003). Estes tipos de fibras são classificados de acordo com as combinações entre diferentes isoformas de MHC, por exemplo a fibra tipo I/IIa expressa simultaneamente as isoformas MHCI e MHCIIa (Pette 2002). As fibras híbridas podem ser observadas com frequência, em processos de transformação, podendo mesmo exceder a quantidade de fibras puras presentes (Pette e Staron 1997; Pette *et al.* 2002).

Assim, actualmente, o conceito de homogeneidade de fibra muscular começa a ser posto em causa, devido à presença, no músculo maturo, de grande quantidade de fibras que expressam mais do que uma isoforma de MHC.

No entanto, não só as isoformas de MHC contribuem para a heterogeneidade das fibras musculares. Efectivamente, outras proteínas musculares igualmente expressas em distintas isoformas, desempenham um papel importante na heterogeneidade fenotípica do tecido muscular esquelético (Wu *et al.* 2003). Segundo Shiaffino e Reggiani (1996), quase todas as proteínas envolvidas na contracção muscular, e.g., MHC, miosinas de cadeia leve (MLC), troponinas I, T e C, actinina, proteína C e α -actina, são expressas em pelo menos duas isoformas, tanto nos músculos de contracção rápida, como nos músculos de contracção lenta. Desta forma, a multiplicidade de isoformas de miosinas, bem como de outras proteínas miofibrilares, constitui a base molecular para a diversidade de fibras encontradas no tecido muscular esquelético (Pette 2002).

Uma vez que a miosina constitui mais de 40% do total de proteínas expressas no músculo esquelético (Allen *et al.* 2000; Merrifield e Atkinson 2000), e que as suas subunidades são expressas em distintas isoformas, a maioria dos estudos reporta-se às suas isoformas para caracterizar as alterações funcionais ocorridas a nível muscular (Sugiura *et al.* 1992; Adams e Baldwin 1995; Esser e White 1995; Williamson *et al.* 2000; Pette *et al.* 2002). A miosina hexamérica é uma proteína com um peso molecular relativamente elevado (cerca de 500 KDa), constituída por 2 cadeias pesadas idênticas (de 170-240 KDa cada) e quatro cadeias leves não idênticas (de 16-23 KDa cada), designadas de reguladoras (MLC2) e de essenciais (MLC1 e MLC3) (Kendrick-Jones *et al.* 2001). Efectivamente, cada uma das cadeias pesadas de miosina combina-se com duas cadeias leves, uma essencial ou alcalina e outra reguladora ou fosforilável (Gonzalez *et al.* 2002). A combinação específica de isoformas de MHC com isoformas de MLC resulta em distintas moléculas de miosina, frequentemente designadas de isomiosinas, apresentando diferentes propriedades funcionais (Pette 2002; Stevens *et al.* 2004). No músculo esquelético de coelho e de rato, as isoformas de MHCI associam-se às isoformas lentas de MLC reguladoras (MLC2s) e às essenciais (MLC1sa ou MLC1sb). De forma idêntica, as isoformas de MHCII combinam-se com isoformas de MLC rápidas, nomeadamente as reguladoras (MLC2f) e as essenciais (MLC1f e MLC3f) (Jarva *et al.* 1997; Bottinelli e Reggiani 2000). As MLCs existentes no músculo esquelético, embora não sejam essenciais para a actividade enzimática da miosina, são importantes para as

propriedades contrácteis das fibras musculares (Saitoh *et al.* 1999; Wahrmann *et al.* 2001; Gonzalez *et al.* 2002). O papel desempenhado pelas MLCs na velocidade máxima de encurtamento das fibras (V_{max}) foi sugerido após a observação de que a V_{max} é mais elevada em fibras contendo grandes quantidades da isoforma MLC3f (Wada *et al.* 2003). Neste sentido, Wada *et al.* (2003) sugeriram que a variabilidade da V_{max} , observada nas fibras tipo II, é atribuída parcialmente às isoformas alcalinas de MLC.

4.1.2. Plasticidade muscular

As fibras musculares são estruturas dinâmicas capazes de alterar o seu fenótipo em resposta a estímulos mecânicos, neuronais ou hormonais (Pette e Staron 2000; Stevens *et al.* 2004). No entanto, esta maleabilidade muscular de resposta a estímulos variados não é exclusiva das fibras musculares, surgindo também alterações nas estruturas que lhes estão associadas, nomeadamente nas terminações nervosas, nos capilares e no tecido conjuntivo (Fluck e Hoppeler 2003).

A capacidade que o músculo esquelético apresenta de modular o seu fenótipo em resposta a exigências funcionais ou a lesão é específica do estímulo imposto (Smith *et al.* 1999). Efectivamente, numerosos estudos têm demonstrado que o aumento da actividade neuromuscular ou de sobrecarga, i.e., a estimulação crónica de baixa frequência, o treino de resistência, o treino de força e a sobrecarga de um músculo por remoção de um músculo sinergista, resultam num aumento da proporção de fibras de contracção lenta em detrimento das fibras de contracção rápida (Talmadge 2000; Pette 2002). Em oposição, a diminuição da actividade neuromuscular ou ausência de carga, i.e., a desnervação, o isolamento da espinal-medula, a suspensão dos membros traseiros, a imobilização e o voo espacial, conduzem a um aumento percentual de fibras de contracção rápida em prejuízo das fibras de contracção lenta (Pette e Staron 1997; Saitoh *et al.* 1999; Talmadge 2000; Pette 2002). Em adição aos estímulos neuronais e mecânicos, também as alterações nos níveis de hormonas, especialmente da hormona tiróideia, podem influenciar a transformação das isoformas de miosinas (Caiozzo *et al.* 1997; Merrifield e Atkinson 2000).

A estimulação crónica de baixa frequência (ECBF), dada a sua alta reprodutibilidade, constitui uma das metodologias experimentais mais utilizadas com o intuito de aumentar a actividade neuromuscular (Pette e Vrbova 1999; Putman *et al.* 2001). Pette *et al.* (2002)

mostraram que a ECBF do músculo EDL de rato, predominantemente constituído por isoformas de MHCIIB, induziu transformações sequenciais para isoformas de MHC IIX/D e IIA, não tendo sido detectada a presença da isoforma de MHCI. De facto, resultados idênticos foram obtidos num outro estudo (Jarvis *et al.* 1996), o qual, para além de observar o mesmo tipo de transformações fenotípicas, verificou que a sobre-expressão da isoforma MHCI ocorria apenas quando era aumentado o tempo diário da estimulação de baixa frequência. Pette *et al.* (2002), referiram não só uma diminuição ou mesmo ausência da expressão da isoforma de MHCI após ECBF, como verificaram, ainda, a ocorrência de um aumento significativo da expressão desta isoforma de MHC quando um processo de degeneração (induzido por injeção de bupivacaína) e subsequente regeneração do músculo EDL precedia a estimulação crónica de baixa frequência. Estes autores constataram ainda, que a sobre-expressão de MHCI se restringia às fibras regeneradas, sugerindo, desta forma, a possível participação de CS na expressão desta isoforma de MHCI. Já anteriormente, Takahashi *et al.* (1993) salientaram a contribuição de CS nas transformações fenotípicas de fibras tipo II em fibras tipo I. Também Putman *et al.* (2000) observaram que a ECBF de músculos EDL de ratos Wistar, conduziu a um aumento de proliferação e diferenciação de CS, bem como a um incremento da expressão da isoforma de MHC embrionária. Estes autores referiram, ainda, que o aumento do conteúdo mionuclear das fibras de contracção rápida causado pela fusão destas células precursoras, poderia contribuir para as alterações fenotípicas observadas após a ECBF.

As transformações na expressão das isoformas de MHC são acompanhadas por alterações sequenciais das isoformas de MLC rápidas para isoformas de MLC lentas, resultando num elevado número de isomiosinas (Leeuw e Pette 1996). Os escassos trabalhos experimentais que avaliam as alterações de MLC induzidas por este tipo de estímulo baseiam-se, essencialmente, nas modificações do grau de fosforilação das MLC2. De facto, Klug *et al.* (1982) observaram que músculos de coelhos sujeitos a ECBF apresentavam uma redução na fosforilação das isoformas de MLC2. Os resultados deste estudo vão de encontro à noção de que a ECBF induz transformações de fibras de contracção rápida em fibras de contracção lenta e mostra, também, que as fibras tipo I apresentam um nível inferior de fosforilação comparativamente às do tipo II (Bozzo *et al.* 2003).

Skorjanc *et al.* (1998) observaram que, para além das alterações nas isoformas de miosina observadas após ECBF, ocorreram também modificações no perfil metabólico das fibras musculares, nomeadamente um decréscimo de actividade de enzimas glicolíticas e um incremento da actividade de enzimas oxidativas a nível mitocondrial. Por seu lado, Hood *et al.* (1989) constataram que a ECBF conduziu a um aumento de cerca de 5 vezes a actividade da citrato sintetase e a uma redução de 50% da actividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Alguns estudos referem ainda que as alterações funcionais desencadeadas pelo aumento da actividade contráctil associada à ECBF são qualitativamente similares às encontradas em protocolos de treino de resistência. Efectivamente, Demirel *et al.* (1999) verificaram que o aumento na duração do treino diário resultou em transformações de maior magnitude de fibras de contracção rápida em fibras de contracção lenta, nos músculos *soleus*, EDL e *plantaris* de rato. Howald *et al.* (1985) mostraram, ainda, que indivíduos sujeitos a um treino de resistência com a duração de 6 semanas apresentavam um aumento do volume mitocondrial em todos os tipos de fibras musculares, embora o incremento fosse mais notório nas fibras tipo IIa. Wada *et al.* (2003) observaram em ratos Wistar, após a realização de um protocolo de exercício de resistência com a duração de 10 semanas, não só alterações na expressão das isoformas de MHC, mas também nas isoformas de MLC. Os resultados deste estudo mostraram que as transformações nas isoformas, quer de MHC, quer de MLC, se restringiam apenas aos subtipos de contracção rápida. As alterações observadas consistiram num decréscimo da expressão da isoforma MHCIIb, num incremento da isoforma de MHCIIId e de MHCIIA, num ligeiro aumento da isoforma de MLC1f e numa diminuição acentuada da isoforma de MLC3f. Uma vez que as fibras tipo IIb apresentam uma maior afinidade para a isoforma MLC3f comparativamente às fibras tipo IIId e IIa (Wada e Pette 1993), o decréscimo observado relativamente à isoforma MLC3f poderá estar relacionado com a inerente diminuição da expressão da isoforma de MHCIIb.

O treino de alta intensidade parece induzir um aumento do volume miofibrilar e, assim, melhorar a capacidade da fibra em produzir força. Kadi e Thornell (2000), sugerem que após dez semanas de treino de força, as miofibras necessitam de mionúcleos adicionais para suportar a hipertrofia muscular. Já estudos anteriores tinham demonstrado o aumento do número de mionúcleos, após sobrecarga de músculos de gato (Allen *et al.* 1995) e de rato (Roy *et al.* 1999). Mais ainda, Kadi e Thornell, (2000) sugerem que o aumento de proliferação e incorporação de CS nas fibras musculares existentes poderá estar subjacente ao processo de hipertrofia decorrente da realização de um treino de

força. Adicionalmente, a fusão de CS intersticiais resulta na formação de novas fibras de reduzidas dimensões e que expressam isoformas de MHC embrionária e neonatal (Kadi e Thornell 1999). Adicionalmente ao processo de hipertrofia, Adams *et al.* (1993) verificaram que o treino de força em humanos conduziu a uma sobre-regulação das isoformas de MHCIIA e, eventualmente, das isoformas de MHCI, enquanto que a expressão da isoforma de MHCIX se apresentou sob-regulada.

A conversão de fibras musculares é também frequentemente observada em modelos com inerente decréscimo da carga mecânica, bem como, na diminuição da actividade contráctil (Stevens *et al.* 1999). Vários estudos (Allen *et al.* 1996; Talmadge *et al.* 1996) têm demonstrado que em animais sujeitos a modelos experimentais com recurso à ausência de carga, ocorrem transformações reversíveis nas isoformas de MHC (I → IIa → II(x) → IIb). Talmadge *et al.* (1996) mostraram, no músculo *soleus* de ratos Wistar sujeitos, durante um período de 14 dias, a uma suspensão dos seus membros traseiros ou a voo espacial, um aumento na proporção de fibras rápidas em detrimento das fibras lentas. Estes autores observaram, ainda, a presença de uma grande proporção de fibras híbridas em ambos os modelos. De forma idêntica, Talmadge *et al.* (1995) verificaram, após trinta dias de isolamento da espinal medula, a presença de múltiplas fibras híbridas e um aumento das isoformas de MHCIIA e IID/X com detrimento das isoformas MHCI.

Estudos mais recentes, utilizando como modelo de ausência de carga a suspensão do membro traseiro, não se restringiram apenas ao estudo das alterações das isoformas de MHC, mas também às alterações do perfil das isoformas de MLC. Stevens *et al.* (2000), após terem submetido durante um período de 14 dias ratos Wistar à suspensão dos seus membros traseiros, verificaram que no músculo *gastrocnemius* as transformações fenotípicas das isoformas de MHC se confinaram apenas às fibras de contracção rápida, i.e., ocorreu um aumento acentuado das isoformas MHCIIIB e de MHCIIID/X, em detrimento da isoforma MHCIIA. Relativamente às isoformas de MLC, as alterações observadas foram praticamente exclusivas das isoformas de MLC alcalinas ou essenciais, i.e., ocorreu um incremento acentuado das isoformas de MLC1f e MLC3f e um decréscimo da isoforma MLC1s. A elevada afinidade da isoforma MLC3f para as isoformas MHCIIIB e MHCIIID/X justifica o aumento significativo desta isoforma de MLC. Utilizando o mesmo modelo experimental acima descrito, Bozzo *et al.* (2003), verificaram que, concomitantemente à transformação de fibras de contracção lenta em fibras de

contração rápida, ocorreu no músculo *soleus* um aumento do grau de fosforilação, quer da isoforma MLC2s, quer da isoforma MLC2f.

4.1.2.1. Vias de sinalização envolvidas nas alterações fenotípicas do tecido muscular esquelético

A conversão de fibras musculares representa um processo altamente coordenado de regulação genética (Pette e Staron 2000). Numerosas vias de sinalização, incluindo proteínas citoplasmáticas e factores de transcrição, funcionam como potenciais reguladores da expressão genética no músculo esquelético (Seward *et al.* 2001; Fluck e Hoppeler 2003). Neste contexto, a re-programação nuclear, via moléculas de sinalização, poderá funcionar como um evento importante na plasticidade muscular podendo estar na base das adaptações observadas a nível do *turnover* proteico, tipo de miosina e, eventualmente, na manutenção da razão núcleo:citoplasma (Fluck e Hoppeler 2003).

As vias do Ca^{2+} -calmodulina/calcineurina, do MAPK e da AMPK e a via que engloba os membros da FRMs, parecem ter um papel importante, embora não exclusivo, na regulação da expressão genética e, conseqüentemente, nas alterações musculares esqueléticas após determinado tipo de estímulos. De facto, desde há muito tempo que se especula acerca do papel do ião cálcio na conversão de fibras rápidas para lentas (Pette 2002). Uma das vias que tem sido implicada é a via do Ca^{2+} -calmodulina/calcineurina (Chin *et al.* 1998). A calcineurina é uma fosfatase dependente do Ca^{2+} -calmodulina, que é activada pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio promovendo a desfosforilação do factor de transcrição NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) e a sua translocação para o núcleo (Torgan e Daniels 2001). Uma vez no núcleo, o NFAT liga-se a nucleótidos específicos da região promotora e a sequências *enhancer* existentes nas regiões reguladores de genes que codificam proteínas características das fibras de contração lenta (Wackerhage e Woods 2002). Vários estudos experimentais têm sido desenvolvidos com o intuito de analisar o papel da calcineurina nas transformações fenotípicas musculares esqueléticas. De facto, Naya *et al.* (2000), verificaram que fibras de ratos transgénicos expressando calcineurina activa, apresentavam uma sobre-regulação de genes que codificam a MHCI e uma sob-regulação dos genes correspondentes a MHC rápidas. De forma idêntica Bigard *et al.* (2000) constataram que os músculos *soleus* de ratos tratados durante um período de 3 semanas com ciclosporina A (um inibidor da

calcineurina) exibiam uma redução acentuada da expressão de MHCI. Contudo, num estudo desenvolvido por Swoap *et al.* (2000), foi observado que a calcineurina pode também aumentar a expressão de alguns genes específicos das fibras de contracção rápida. Efectivamente, estes estudos são unânimes acerca da importância da calcineurina na regulação da expressão fenotípica do músculo esquelético. No entanto, parece não existir muita concordância sobre a forma como intervêm neste processo.

Um aumento da actividade muscular provoca perturbações agudas, quer do ambiente físico, quer dos constituintes químicos, sugerindo que factores mecânicos e metabólicos funcionem como sinais com responsabilidade nas adaptações fenotípicas subjacentes ao exercício físico (Hoppeler e Fluck 2002). Os factores mecânicos podem interagir com integrinas do citoesqueleto, resultando na activação da via de sinalização da MAPK (Aronson *et al.* 1997). O papel dos factores mecânicos na activação desta via de sinalização é suportado por estudos *in vivo*, que demonstram poderem estes factores modelar a indução da transcrição dos genes *c-jun* e *c-fos* (Hoppeler e Fluck 2002).

As MAPK são cascatas de cinases que utilizam a fosforilação proteica como mecanismo de sinalização (Wackerhage e Woods 2002). Efectivamente, as MAPKs podem activar por fosforilação, numerosas proteínas citoplasmáticas como a *p90 ribosomal S6 kinase* (RSK) e a fosfolipase A₂ (Aronson *et al.* 1997). Adicionalmente, esta via de sinalização está directamente implicada na fosforilação de diversos factores de transcrição nucleares, de que são exemplo o *c-myc*, o *c-fos* e a *Elk-1* (Yu *et al.* 2003).

Nas células dos mamíferos, existem pelo menos 3 vias distintas, mas relacionáveis, de cascatas de MAPK, i.e., a ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) a JNK (*Jun N-terminal kinases*) e a p38 (Wackerhage e Woods 2002; Yu *et al.* 2003). Embora estas 3 vias de sinalização sejam activadas em resposta ao exercício físico, a maioria dos trabalhos experimentais incide principalmente no estudo da via MAPK/ERK (Nader e Esser 2001; Shefer *et al.* 2002; Haddad e Adams 2004). Segundo Shefer *et al.* (2002) a activação desta via de sinalização parece ter um papel importante na regulação dos genes envolvidos no ciclo celular e, conseqüentemente, na proliferação celular. Por exemplo, a activação da ERK2 tem sido referida como indispensável para a expressão da ciclina D1 e, dessa forma, promover a proliferação celular.

Também várias perturbações metabólicas, inerentes a protocolos de exercício físico de alta intensidade, tais como, a diminuição do pH e da pressão de oxigénio, e o aumento da concentração celular de adenosina monofosfato (AMP) e da produção de EROs, podem estar envolvidas no controlo da expressão genética muscular (Fluck e Hoppeler 2003).

Efectivamente, Pette *et al.* (2002) referem que alterações no potencial de fosforilação do ATP poderão resultar na activação da 5' *AMP-activated protein kinase* (AMPK), uma importante via de sinalização ligada ao controlo da expressão genética muscular. A activação desta via tem sido, assim, relacionada com adaptações metabólicas como o aumento da actividade de enzimas mitocondriais e aumento nos transportadores de glicose (Winder 2001). Pette *et al.* (2002), referem ainda que a activação da via AMPK por ECBF induz uma re-programação ao nível de proteínas metabólicas envolvidas no metabolismo glicolítico e oxidativo.

Embora estas vias de sinalização tenham um papel importante na regulação da expressão genética do tecido muscular esquelético, parecem, contudo, não explicar por si só todos os fenómenos subjacentes à plasticidade muscular.

4.1.2.2. Células *stem* e plasticidade muscular

As células *stem* são células indiferenciadas presentes em tecidos especializados. Estas células podem ser frequentemente encontradas na medula óssea, no sangue, no cérebro, na espinal-medula, no músculo esquelético, no epitélio da pele, na córnea e na retina, no fígado e no tracto gastrointestinal. A sua principal função é manter a actividade funcional tecidual, substituindo células que são lesadas ou destruídas (Zammit e Beauchamp 2001). Desta forma, o tecido muscular esquelético constitui um exemplo adequado de tecido que, para a sua manutenção, necessita de uma população de células *stem*.

Durante vários anos persistiu a noção de que as células *stem* existentes nos tecidos adultos eram unipotentes, diferenciando-se apenas no tipo celular ao qual estavam associados. Contudo, vários estudos recentes têm demonstrado a pluripotencialidade deste tipo de células precursoras, uma vez que quando são expostas a novos ambientes possuem a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares (Lagasse *et al.* 2000). Por exemplo, diversos trabalhos experimentais têm demonstrado a capacidade que as células hematopoiéticas possuem de se diferenciarem em células neuronais, em cardiomiócitos, em células musculares e em hepatócitos (para refs ver Zubair *et al.* 2002). Também células *stem* derivadas do sistema nervoso central, após serem transplantadas, parecem ser capazes de se diferenciar em células hematopoiéticas e em células musculares esqueléticas (Asakura 2003).

Estudos semelhantes têm sido efectuados com células isoladas do tecido muscular esquelético. De facto, trabalhos experimentais utilizando culturas de CS demonstraram que este tipo de células precursoras musculares são capazes de se diferenciar em osteócitos ou em adipócitos, após tratamento com proteínas morfogénicas do osso (BMPs) ou com indutores adipogénicos (como os ácidos gordos), respectivamente (Asakura *et al.* 2001). Desta forma, a noção de que as CS são unipotentetes, capazes de se diferenciar apenas em células da linhagem miogénica tem sido posta em causa quer pelos trabalhos desenvolvidos por Asakura *et al.* (2001), quer por trabalhos posteriores dentro do mesmo âmbito (Wada *et al.* 2002).

Da mesma forma, a ideia de que o processo de regeneração muscular esquelético se processa exclusivamente à custa da população de CS que se encontra associada, tem sido alterada através da constatação de que o tecido muscular esquelético contém várias populações de células *stem* (Asakura *et al.* 2002; Asakura 2003; Huard *et al.* 2003; Peng e Huard 2004). De facto, segundo Asakura *et al.* (2003), no músculo esquelético em adição às CS, existe uma população heterogénea de células *stem*, frequentemente designada de *side population* (SP). Gussoni *et al.* (1999) referem, ainda, que uma fracção das células *stem* SP apresenta potencial hematopoiético, ou seja, exhibe marcação positiva com o anticorpo CD45. De acordo com estes investigadores, esta população de células *stem*, com características hematopoiéticas, quando injectada de forma intravenosa em ratos submetidos a radiações, tem a capacidade de contribuir para a regeneração dos músculos afectados.

Embora a responsabilidade do processo regenerativo seja principalmente, das células *stem* presentes no tecido muscular, células *stem* derivadas de outros tecidos podem contribuir, ainda que parcialmente, no referido processo (Peng e Huard 2004).

A participação das células satélite e de outras células *stem* musculares no processo de regeneração após um estímulo nocivo, tem sido largamente descrita na literatura (McCormick e Thomas 1992; Kadi e Thornell 2000; Thornell *et al.* 2003). Nestes estudos, foi claramente demonstrado que as células *stem*, após diferenciação, se fundem, ou entre si ou com as fibras adjacentes, adicionando mionúcleos e, conseqüentemente, material genético, de forma a manterem constante a razão núcleo:citoplasma. Também a expressão de isoformas de miosina, características do período embrionário e fetal, i.e., MHC emb e MHC fetal, detectada frequentemente em músculos regenerados, parece ser uma consequência da adição de mionúcleos, uma vez que os músculos maduros não expressam este tipo de isoformas (Baldwin e Haddad 2001). Adicionalmente, a

observação de fibras em aparente *splitting* em músculos sujeitos a processos de degeneração e conseqüente regeneração, poderá reflectir a fusão incompleta, por parte destas células precursoras, às fibras musculares adjacentes (Appell *et al.* 1988).

A vasta literatura existente sobre a participação das células precursoras miogénicas no processo de regeneração muscular não relaciona, no entanto, este tipo celular com os fenómenos de plasticidade muscular. De facto, são escassos, e muitas vezes contraditórios, os trabalhos experimentais que investigam o papel das células *stem* musculares em fenómenos de conversão de fibras musculares. Os estudos existentes recorrem ao uso de radiações com o propósito de inibir a proliferação das CS e de outras células *stem* existentes no tecido muscular (Rosenblatt *et al.* 1994; Phelan e Gonyea 1997; Adams *et al.* 2002). Por exemplo, Rosenblatt *et al.* (1994) submeteu músculos EDL a sobrecarga, por remoção do músculo sinergista, com posterior exposição a uma radiação de 25 Gy. Neste estudo, estes investigadores verificaram que os músculos em questão não sofriam fenómenos de hipertrofia nem adição de novos mionúcleos, mas apresentavam alterações na expressão fenotípica a nível das isoformas de MHC. Um estudo idêntico, desenvolvido por Adams *et al.* (2002), utilizando quer o mesmo estímulo lesivo, quer a mesma quantidade de radiação, constatou que, para além da ausência de hipertrofia muscular, se verificaram maiores alterações fenotípicas nos músculos submetidos a radiação. Da mesma forma, para Allen *et al.* (1999), o facto da radiação gama inibir a proliferação das células precursoras miogénicas e não impedir as transformações de fibras musculares após os músculos serem submetidos a estimulação, sugere que a adição de mionúcleos via CS não funciona como um pré-requisito para que ocorram alterações nas isoformas de MHC. Mais ainda, estes autores atribuem exclusivamente aos mionúcleos existentes nas fibras diferenciadas, as transformações fenotípicas observadas após o tecido muscular ter sido submetido a um estímulo lesivo. Contudo, um estudo desenvolvido por Phelan e Gonyea (1997) refere, de forma explícita, que a radiação inibe apenas parcialmente a proliferação das CS, e não previne a expressão de isoformas de MHC embrionárias após agressão muscular. Também Mozdziak *et al.* (1996) constataram, *in vivo* e *in vitro*, que uma dose de radiação de 25 Gy não inibe na totalidade a proliferação de CS. A identificação de populações de células *stem* que são resistentes à radiação (Morgan e Partridge 2003) e a participação em fenómenos de regeneração muscular por parte de células *stem* extramusculares (Ferrari *et al.* 1998), leva a questionar sobre a hipotética participação por parte deste tipo de células em fenómenos de adaptação muscular.

Uma vez que os trabalhos que utilizam a radiação como meio de inibição de células em proliferação, são controversos e, desta forma, não tornam claro o papel quer dos mionúcleos, quer das CS nos fenómenos de plasticidade muscular, neste estudo tornou-se necessário a utilização de outro meio de inibição da proliferação celular, a colchicina. Este, é um fármaco anti-neoplásico que inibe a polimerização microtubular e, dessa forma, bloqueia a replicação celular em fase M do ciclo celular (Khan 1995; Jordan 2002; Jordan e Wilson 2004).

Assim sendo, este trabalho experimental teve como objectivo principal verificar quais as alterações fenotípicas que se observam após indução de lesão em animais com e sem administração de colchicina. De forma a alcançar o objectivo proposto, foram delineados dois objectivos específicos:

- a) comparar o grau de proliferação celular após lesão muscular
- b) verificar as alterações fenotípicas, quer das isoformas de MHC (MHCIIA, MHCIIX/D e MHCIIB) e das isoformas de MLC (MLC1f, MLC3f e MLC2f), quer de proteínas metabólicas (piruvato cinase e enolase)

4.2. Material e Métodos

A - Protocolo experimental

Cento e trinta e dois ratinhos machos de 8 semanas de idade da estirpe Charles River CD1 e com um peso médio entre 35 e 40 gramas foram colocados em gaiolas (2 animais por gaiola) e aleatoriamente distribuídos em dois grupos: um grupo tratado com colchicina [3 x 0,1 ml de uma solução de 0,5 mg de colchicina (C-9754 Sigma) /Kg de peso] (n=66) (Pietsch 1961) administrada i.p., e um grupo não tratado com colchicina ao qual foi igualmente administrada via i.p. uma solução salina placebo (0,9% de NaCl) nas mesmas condições (n=66). Os animais de ambos os grupos foram submetidos a um estímulo traumático de acordo com o descrito no capítulo anterior. Sucintamente, a lesão muscular foi induzida pela queda de uma esfera metálica através de um tubo cilíndrico sobre uma outra esfera colocada em contacto directo com a superfície cutânea do músculo *gastrocnemius* da pata esquerda do rato (Wright-Carpenter *et al.* 2004). A pata direita do animal não sofreu qualquer tipo de lesão, sendo utilizada como controlo. Tendo em conta os diferentes subgrupos experimentais, o sacrifício dos animais foi efectuado imediatamente e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias após a indução da lesão (n=6 para cada subgrupo).

Todos os animais do grupo com colchicina foram injectados com o fármaco anti-neoplásico, imediatamente, 2 e 4 dias após a indução de lesão. Quarenta e oito horas antes do sacrifício, os animais tratados com colchicina ou com solução placebo foram injectados com 50mg de BrDu/Kg de peso (B-9285 Sigma).

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo-lhes retirado o músculo *gastrocnemius*, para análise bioquímica. Três músculos de cada subgrupo, de ambos os grupos experimentais, foram utilizados de imediato para a extracção do DNA. Os restantes músculos de cada subgrupo foram divididos de forma simétrica e longitudinal e os fragmentos resultantes foram congelados para posterior separação de proteínas por electroforese monodimensional e bidimensional.

Todos os procedimentos seguiram as especificações e as recomendações do *National Institute of Health (NIH) Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

A.1. - Avaliação de células mitoticamente activas por *South Western*

Extracção de DNA

Os músculos *gastrocnemius* foram cortados em pequenos pedaços de forma a permitir a extracção do seu DNA de acordo com o descrito em material e métodos no capítulo 2 (pág 17).

Avaliação das células em proliferação por *South Western*

A semi-quantificação das células mitoticamente activas foi efectuada utilizando um anticorpo anti-BrdU, de acordo com a metodologia desenvolvida por Knobloch *et al.* (2002) com algumas modificações como o descrito no capítulo 2 (pág 18).

A. 2. - Separação das isoformas das cadeias pesadas de miosina por electroforese monodimensional

A separação das isoformas das miosinas de cadeia pesada por electroforese monodimensional foi efectuada segundo o protocolo descrito por Talmadge e Roy (1993) com algumas adaptações. Assim, procedeu-se à extracção das miosinas colocando o músculo *gastrocnemius* congelado em 300 µl de tampão de redução (4% SDS, 0,5M Tris, pH 6,8, 20% Glicerol) num banho a 60°C, por um período de 30 minutos. Seguidamente as amostras foram homogeneizadas num *potter* de vidro e centrifugadas a 1000g durante 10 minutos (Rajab *et al.* 2000).

Após a determinação do teor proteico no sobrenadante obtido pelo método de Lowry (Lowry *et al.* 1951), os extractos de miosina foram diluídos com o tampão de redução (1% de mercaptoetanol, 4% SDS, 0,5M Tris, pH 6,8, 20% Glicerol e 0,2% azul bromofenol) a uma concentração proteica final de 0,2 mg/ml. Ferveram-se as amostras durante 5 minutos e aplicou-se 1 µg de proteína em cada poço do gel.

A composição dos géis foi elaborada de acordo com Talmadge e Roy (1993). O *stacking* gel foi constituído por 30% de glicerol, 4% de acrilamida-bis acrilamida (50:1), 70mM de Tris (pH 6,8), 4mM de EDTA e 0,4% de SDS. Para a elaboração do *running* gel adicionou-se 30% de glicerol, 8% de acrilamida/bis acrilamida (50:1), 0,2M de Tris (pH 8,8), 0,1M de glicina e 0,4% de SDS. Com o intuito de iniciar a polimerização dos géis,

adicionou-se 0,05% de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amónio (APS). A corrida foi efectuada numa tina de electroforese para minigeis (Biorad mini-Protean III), a uma voltagem constante de 70V e com uma duração aproximada de 24 horas. Dentro da tina de electroforese colocou-se o tampão de corrida (0,1M Tris, 150mM glicina e 0,1%SDS), e na parte de fora da tina (tampão de baixo) colocou-se o mesmo tampão diluído 2 vezes. Terminada a corrida, os géis foram corados com o método de prata irreversível (Yan *et al.* 2000).

A.3. - Electroforese bidimensional (2D)

Na electroforese bidimensional as proteínas foram separadas numa primeira dimensão de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI) através da focagem isoeléctrica e seguidamente numa segunda dimensão, de acordo com o seu peso molecular utilizando um gel SDS PAGE.

A focagem isoeléctrica foi efectuada num sistema IPGphor (Amersham Pharmacia Biothec). Utilizou-se tampão de rehidratação (8M ureia, 2M tiureia, 12,9 mM DTT, 0,1% Pharmalyte pH 3-10, 1% Chaps) para solubilizar a amostra (cerca de 50µg de proteína) e aplicou-se 250 µl de amostra no ânodo. Seguidamente, as tiras de 13 cm com gradiente de pH entre 3 e 10 (IPG), foram cobertas na totalidade com o *Drystrip Cover Fluid*, de forma a proteger a tira da desidratação durante o tempo de focagem. As tiras foram colocados no aparelho IPGphor e a electroforese foi iniciada por uma etapa de rehidratação (12h a 50mA/tira). O programa de focagem utilizado foi de 1h a 500V, seguido de 1h a 1000V e de 3h a 8000V.

Após a finalização da primeira dimensão, as tiras foram removidas e equilibradas com um tampão contendo 50Mm Tris pH 8,8, 6M ureia, 30% glicerol e 2% SDS, durante aproximadamente 15 minutos.

Na segunda dimensão utilizou-se um gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) sobre o qual se aplicou a tira. O gel correu num sistema Hoefer-SE 600 (Amersham Pharmacia Biothec) acoplado a uma fonte de tensão eps-601 (Amersham Pharmacia Biothec).

Prepararam-se os géis de SDS-PAGE a 15% com 1mm de espessura de acordo com Laemmli (1970). A polimerização dos géis foi iniciada por adição de TEMED e APS a 10%. O *stacking gel* foi substituído por uma solução selante de agarose a 0,5%.

Depois de preencher a tina de electroforese com o tampão de corrida (25 mM Tris, 192mM de glicina e 0,1% de SDS, pH 8,3), a separação electroforética decorreu durante aproximadamente 5 horas a 200V, 75mA e 15W. Terminada a corrida, os géis foram corados com Coomassie coloidal. Este processo de coloração tem um limite de detecção 10 vezes superior ao do Coomassie blue R250, tem baixo ruído de fundo e não penetra a matriz do gel (condições ideais para posterior análise dos *spots* por espectrometria de massa).

A aquisição das imagens dos géis foi efectuada com um densitómetro GS-710 (BioRad), e a respectiva análise foi realizada com recurso ao *software* PDQuest v7.1 (BioRad).

Os *spots* proteicos foram identificados por comparação com um gel 2D padrão de músculo *gastrocnemius* disponível na *web page* http://www.expasy.org/cgi-bin/map2/noid?MUSCLE_MOUSE

Análise estatística

Os dados deste estudo foram apresentados em percentagem relativamente ao músculo controlo. Os resultados obtidos foram apresentados como média e respectivo desvio padrão. Para verificar a normalidade da distribuição, foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As diferenças estatísticas observadas nos grupos de animais com e sem colchicina ao longo do tempo, bem como as diferenças entre grupos nos diferentes momentos foi realizada recorrendo à análise de variância (ANOVA) multifactorial. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Para o efeito utilizou-se o *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0.

4.3. Resultados

A. 1. Resultados referentes à metodologia de *South Western*

Pela análise da figura 26A, constatou-se que, nos animais tratados com colchicina, não se verificam alterações significativas nos níveis de proliferação celular avaliada pela incorporação de BrdU no DNA. Em oposição, na ausência de colchicina e à semelhança do observado no capítulo 3 (pág 61), verificou-se um aumento significativo da proliferação celular entre o 2º e o 6º dia alcançando o pico máximo ao 6º dia pós lesão. No que diz respeito à influência da administração de colchicina nas variações de proliferação celular, os resultados mostraram que, comparativamente aos animais tratados com colchicina, os animais não tratados com colchicina evidenciaram diferenças significativas no 2º, 4º, 6º e 10º dia.

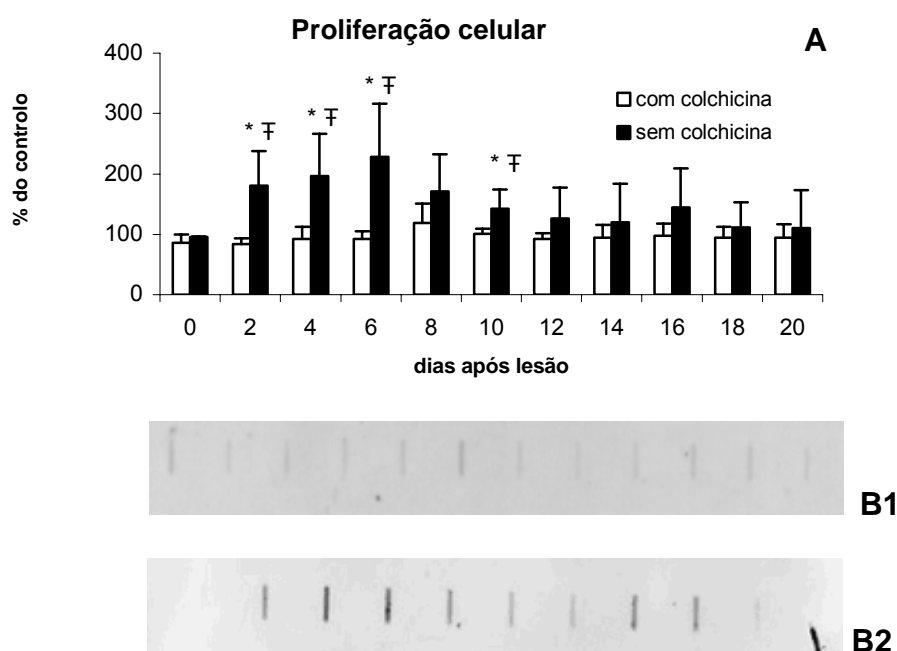


Figura 26 **A)** Representação gráfica dos valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica, em relação ao respectivo músculo controle, para os vários subgrupos experimentais com e sem administração de colchicina. **B)** Filmes representativos do *slot-blot* para os diferentes momentos em que foram sacrificados os animais com (**B1**) e sem (**B2**) a administração de colchicina

* P<0,05 vs com colchicina, para o mesmo tempo; † P<0,05 vs respectivo controle

A. 2. Resultados referentes à análise por electroforese monodimensional de MHC

Pela observação da figura 27A verificou-se que nos animais não administrados com colchicina ocorreram alterações nas isoformas de MHC, tendo-se observado um incremento da isoforma MHCIIA a partir do 4º dia pós lesão e mantendo-se a expressão desta isoforma elevada até aproximadamente ao 12º dia pós trauma. Relativamente à isoforma MHCIIIB, constatou-se um decréscimo do seu valor a partir do 6º dia pós lesão até ao final do processo em estudo. A isoforma MHCIIIX/D decresceu a partir do 10º dia pós lesão mantendo-se em valores abaixo do controlo até ao final do protocolo experimental.

Como se pode constatar pela análise da figura 27B, os animais injectados com colchicina apresentaram valores de DO, referentes quer às isoformas MHCIIIX/D quer às isoformas MHCIIIB, ligeiramente acima do controlo durante os 20 dias de protocolo experimental, embora sem significado estatístico. Relativamente à expressão da isoforma MHCIIA, verificou-se que esta não apresentou grande variação até ao 14º dia pós lesão. Contudo, a partir do 16º dia foi observado um ligeiro incremento na sua expressão. A análise comparativa dos resultados obtidos, tendo em consideração o efeito da colchicina, demonstra que no grupo não tratado com colchicina, comparativamente ao grupo submetido a tratamento com o fármaco, ocorreu um incremento significativo da isoforma MHCIIA entre o 6º e o 12º dia pós lesão e um decréscimo da isoforma MHCIIIB a partir do 6º dia pós lesão até ao final do protocolo em estudo.

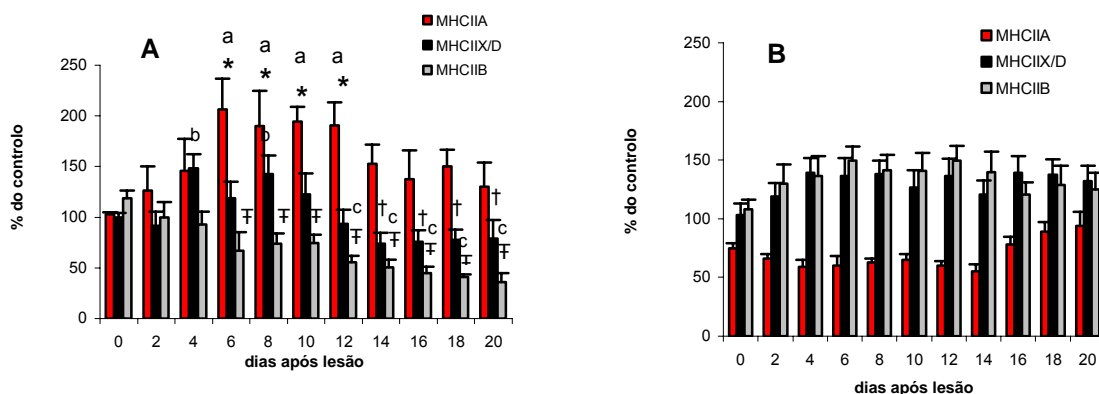


Figura 27 Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) em relação ao respectivo músculo controlo, para as diferentes isoformas de MHC correspondentes aos diferentes dias após a indução de lesão na ausência (A) e na presença (B) de colchicina.

* $p < 0,005$ vs com colchicina para MHCIIA; † $p < 0,005$ vs com colchicina para MHCIIIX/D;

‡ $p < 0,05$ com colchicina para MHCIIIB; a, b, c $p < 0,05$ vs respectivo controlo

A. 3. Resultados referentes à análise proteica por electroforese bidimensional (2D)

As figuras 28 e 29 referem-se a géis de electroforese bidimensional representativos de músculos *gastrocnemius* de animais administrados, ou não, com colchicina e lesados por esmagamento. Por comparação das figuras 28 e 29, pode observar-se uma diminuição acentuada do número de *spots* no gel representativo dos grupos dos animais tratados com colchicina relativamente ao gel dos animais não tratados. De facto, o gel referente a animais tratados com colchicina (figura 29) apresentou 160 *spots*, enquanto que o gel relativo aos animais não tratados com o fármaco (figura 28) evidenciou um total de 208 *spots*.



Figura 28 Gel 2D representativo do *gastrocnemius* de um animal injectado sem colchicina e extraído 18 dias pós lesão. (1- MLC1f 2- MLC2f 3- MLC3f 4- piruvato cinase 5-enolase)

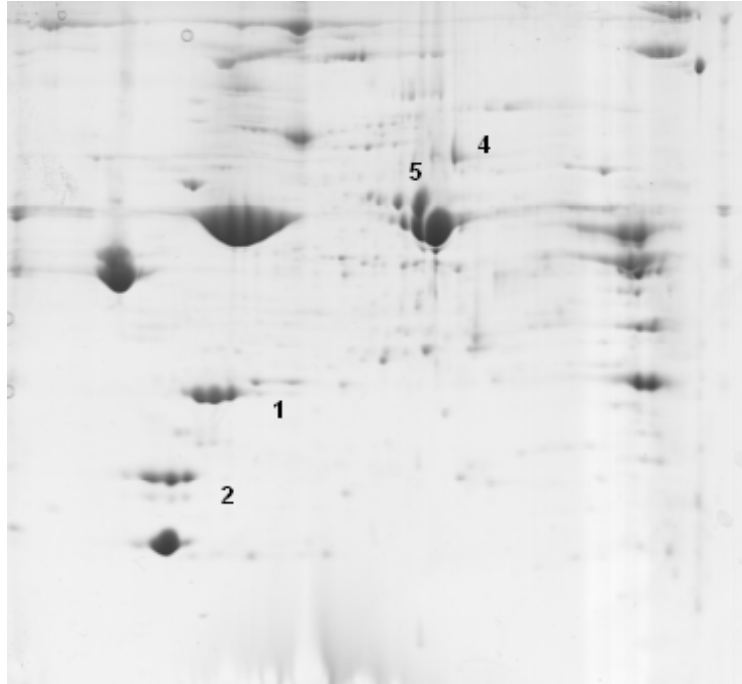


Figura 29 Gel 2D representativo do *gastrocnemius* de um animal tratado com colchicina e extraído 18 dias pós lesão. (1- MLC1f 2- MLC2f 3- MLC3f 4- piruvato cinase 5-enolase)

Pela análise da figura 30 verificou-se a ocorrência de alterações fenotípicas das isoformas de MLC rápidas no *gastrocnemius* dos animais não injectados com colchicina. Efectivamente, observou-se um decréscimo acentuado na expressão da isoforma MLC3f (figura 30A), acompanhado de um incremento na expressão da isoforma MLC1f (figura 30B), particularmente nas fases finais do processo regenerativo em estudo. É ainda de salientar, que a razão $MLC3f/(MLC3f+MLC1f)$ apresentou um comportamento idêntico ao da isoforma MLC3f (figura 30C). Como é possível observar pela análise da figura 30D, a isoforma MLC reguladora, i.e., MLC2f, não sofreu grandes alterações ao longo do período de tempo pós trauma considerado no presente estudo.

Por outro lado, e no que diz respeito aos animais tratados com o fármaco anti-neoplásico, não se observaram grandes modificações no perfil da expressão das várias isoformas de MLC ao longo do processo regenerativo em causa.

Pela análise conjunta dos resultados dos diferentes grupos (com e sem colchicina) verificou-se que foram encontradas diferenças significativas na expressão das MLC3f e MLC1f entre os grupos estudados a partir do 14º dia pós lesão.

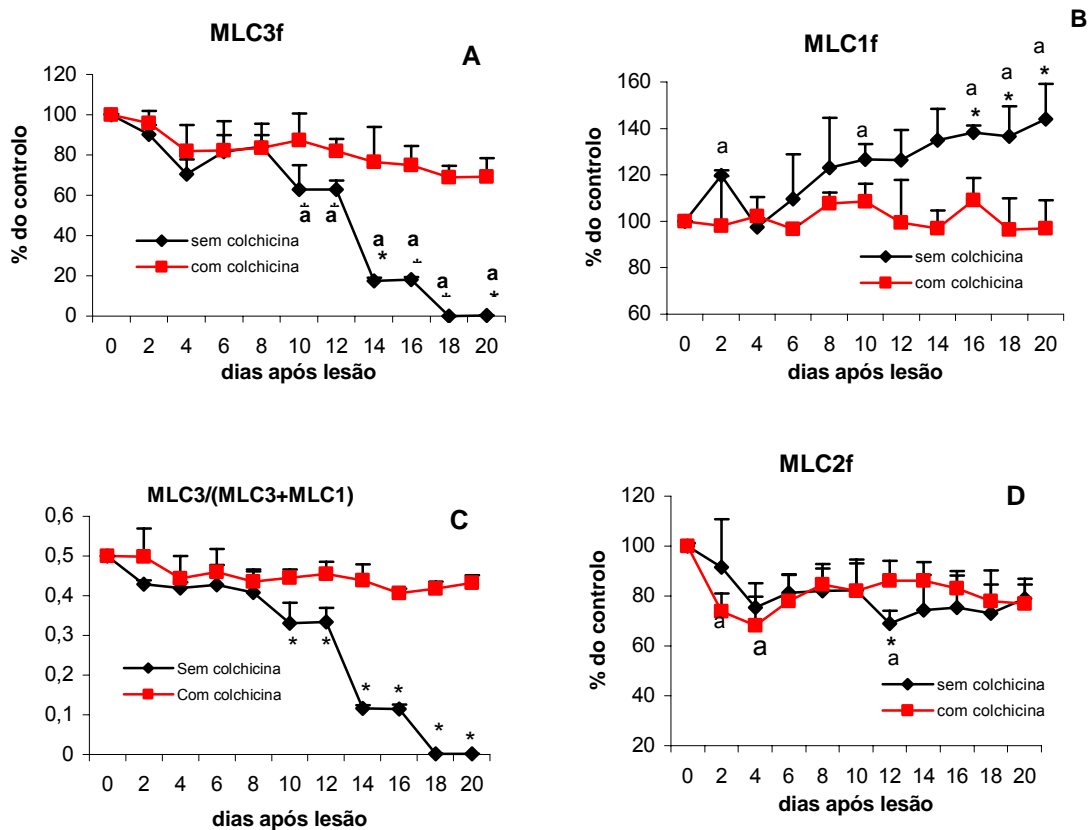


Figura 30 Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) relativa aos músculos controlo para as diferentes isoformas de MLC3f (A), MLC1f (B), para a relação MLC3f/(MLC3f+MLC1f) (C) e para a isoforma MLC2f (D) ao longo dos vários momentos após a indução de lesão na ausência e na presença de colchicina.
* p<0,05 vs com colchicina; a p<0,05 vs controlo

A figura 31 representa as alterações percentuais da expressão das enzimas glicolíticas, enolase e piruvato cinase, nos dois grupos ao longo do processo regenerativo considerado. Os músculos *gastrocnemius* pertencentes aos animais não injectados com colchicina apresentaram um incremento significativo da piruvato cinase, sobretudo nos momentos finais do processo regenerativo (figura 31B). Apesar de uma ligeira instabilidade de variação, verificou-se um incremento da expressão da enzima enolase com tendência para um aumento nas etapas finais do processo regenerativo, embora não estatisticamente significativo (figura 31A).

Por outro lado, no grupo tratado com colchicina, não foram observadas quaisquer variações significativas na expressão de ambas as enzimas ao longo do período considerado.

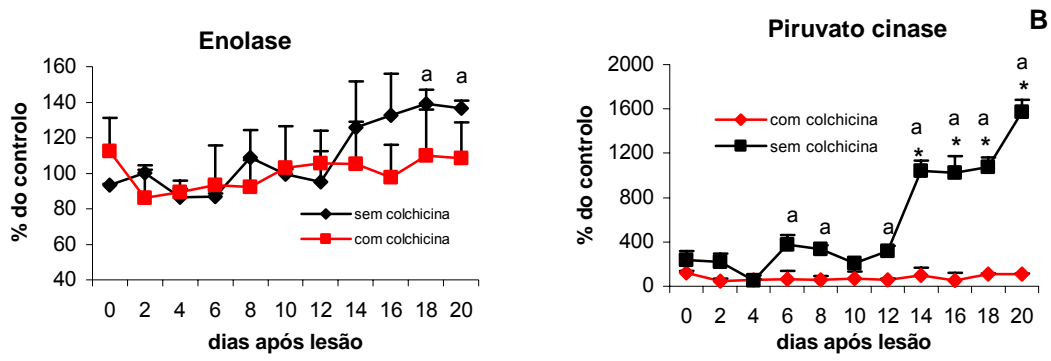


Figura 31 Valores médios e respectivos desvios padrão da variação percentual de densidade óptica (DO) das enzimas metabólicas enolase (A) e piruvato cinase (B) do músculo *gastrocnemius* extraídos dos animais tratados com e sem colchicina ao longo dos vários momentos após lesão
 * p<0,05 vs com colchicina; a p<0,05 vs controlo

4.4. Discussão

No processo de regeneração muscular é inequívoca a importância das CS e de outras células *stem* na adição de novos mionúcleos e, conseqüentemente, material genético às fibras existentes (Mozdziak *et al.* 2001; Hill *et al.* 2003). Com o intuito de avaliar o papel deste tipo de células em fenómenos de plasticidade muscular, administrámos aos animais de um dos grupos experimentais um fármaco anti-neoplásico a fim de inibir a proliferação celular, i.e., a colchicina. Efectivamente, a colchicina actua durante a fase M do ciclo celular por ligação aos fusos mitóticos induzindo, assim, a quebra das proteínas microtubulares (Khan 1995). Na literatura, a radiação tem sido utilizada com frequência para inibir a proliferação celular, em particular das CS. Contudo, esta metodologia de inibição de células em proliferação tem levado a resultados bastante contraditórios. De facto, estudos desenvolvidos por Rosenblatt (1994) e Adams (2002) mostraram que a radiação inibe a proliferação de células precursoras miogénicas. No entanto, outros trabalhos experimentais (Mozdziak *et al.* 1996; Phelan e Gonyea 1997), também recorrendo à utilização de radiação, mostraram de forma evidente que as CS e outras células *stem* são apenas parcialmente inibidas por este meio. Este facto é ainda reforçado pela descoberta de que algumas células *stem* musculares são resistentes à radiação (Morgan e Partridge 2003). Assim, parece-nos que a colchicina, utilizada como inibidor de proliferação celular, poderá funcionar como uma boa alternativa à utilização de radiações.

Pela observação da figura 26 e pelo estudo comparativo dos resultados de proliferação celular com e sem colchicina, pudemos constatar que, de acordo com o referido no capítulo anterior, o estímulo traumático aplicado induziu, de forma significativa, a proliferação celular com maior intensidade entre os dias 4 e 6 após lesão. Adicionalmente, os dados evidenciaram que a colchicina actuou de forma efectiva ao inibir as células em proliferação. Esta análise foi efectuada recorrendo à metodologia de *South Western* que semi-quantifica a incorporação de BrdU pelas células que se encontram na fase S do ciclo celular. Importa salientar que mesmo nos animais tratados com colchicina foi observada alguma incorporação de BrdU, eventualmente sugestivo de proliferação celular. Contudo, este baixo sinal de densidade óptica observado no grupo submetido a tratamento com colchicina, pode não ser sinónimo de proliferação celular, uma vez que a colchicina actua na fase M da mitose e que o BrdU se liga ao DNA durante a fase S. De facto, no grupo tratado com colchicina, algumas células entram em ciclo celular, incorporando BrdU no seu DNA durante a fase S, mas devido à

administração da colchicina param na fase M. Assim, estas células embora apareçam marcadas com o anticorpo anti-BrdU não estão em proliferação.

Num processo de degeneração/regeneração muscular esquelética, a resposta catabólica que ocorre logo após o estímulo lesivo é seguida por uma resposta anabólica na qual se pode observar a formação de novas fibras e a síntese de novas proteínas musculares (Fisher *et al.* 2000). Com o propósito de estudar o processo regenerativo, vários estudos tem recorrido ao trauma por esmagamento como modelo experimental, dada a sua elevada reprodutibilidade (Crisco *et al.* 1994; Beiner *et al.* 1999). No entanto, a análise da regeneração muscular esquelética ao longo do tempo, após um estímulo físico, como o trauma por esmagamento, tem-se cingido praticamente ao estudo das alterações morfológicas e a alguns parâmetros fisiológicos (Crisco *et al.* 1994; Minamoto *et al.* 1999; Minamoto *et al.* 2001). De facto, poucos são os estudos que, com este modelo, se debruçaram sobre as alterações proteicas, nomeadamente de proteínas miofibrilares, como a miosina e as proteínas metabólicas. Convém ainda salientar a escassez de trabalhos experimentais que analisem, simultaneamente, as alterações das isoformas de MHC e de MLC ao longo do processo regenerativo. Deste modo, o nosso protocolo experimental incidiu no estudo, quer qualitativo quer quantitativo, das alterações fenotípicas observadas após a lesão por esmagamento do músculo *gastrocnemius*. De facto, os fenómenos de plasticidade muscular têm sido frequentemente associados a alterações fenotípicas das isoformas de MHC e de MLC. Assim, no nosso protocolo experimental utilizámos músculos de animais injectados com e sem colchicina, e verificámos se ocorriam ou não alterações quer na expressão das isoformas MHC e MLC quer na de proteínas metabólicas. Dado o modelo de indução de lesão utilizado afectar principalmente o músculo *gastrocnemius*, todos os parâmetros analisados foram exclusivamente determinados neste músculo.

Os resultados do nosso estudo mostraram que as alterações fenotípicas, quer das isoformas de MHC, quer das isoformas de MLC, se restringiram às isoformas de contracção rápida. De facto, já em outros trabalhos experimentais (Demirel *et al.* 1999; Allen *et al.* 2001; Wada *et al.* 2003), utilizando músculos essencialmente constituídos por fibras tipo II, as alterações fenotípicas observadas após um estímulo lesivo incidiram principalmente nas isoformas de MHC de contracção rápida. No nosso estudo, o esmagamento do músculo *gastrocnemius* conduziu a uma aparente conversão de fibras com características predominantemente rápidas em fibras com características fenotípicas menos rápidas. De facto, pudemos observar no grupo não tratado com colchicina, a partir

do 4º dia pós lesão, um incremento da isoforma MHCIIA acompanhado de uma diminuição da isoforma MHCIIIB.

Pelo menos do nosso conhecimento, apenas num estudo (Fink *et al.* 2003) foram avaliadas as alterações fenotípicas ao nível das isoformas MHC por recurso ao trauma físico. Nesse estudo, Fink *et al.* (2003), utilizaram músculos *soleus* de ratos Wistar e comparam as alterações fenotípicas observadas em dois modelos distintos de indução de lesão, i.e., o trauma por esmagamento e a injeção com notexina. A ausência da isoforma MHCIIA e a presença exclusiva da isoforma de MHCI no final do processo regenerativo, sobretudo nos músculos lesados com a toxina, sugere uma transformação das características das fibras para fenótipos de contração lenta. Também no nosso estudo, a sobre-regulação da expressão da isoforma MHCIIA e a sob-regulação da isoforma de MHCIIIB, parece resultar, embora de forma incompleta, numa alteração da qualidade funcional de fibras com características rápidas em fibras com características lentas. Contrariamente ao acima referido, nos músculos dos animais aos quais foi administrada colchicina, as alterações das características das isoformas MHC foram claramente atenuadas. Efectivamente, a análise comparativa das figuras 27A e 27B, sugere que o fármaco utilizado, ao inibir a proliferação celular, compromete a conversão das características das MHC associadas a este processo traumático.

Adicionalmente, pudemos observar que as alterações qualitativas nas isoformas MHC foram acompanhadas por transformações no mesmo sentido das isoformas MLC. Pela análise dos resultados do nosso estudo, pudemos observar que as transformações fenotípicas relativas às isoformas MLC, para além de se limitarem às isoformas de contração rápida, tal como sucedeu com as isoformas MHC, foram mais evidentes nas isoformas MLC alcalinas do que nas isoformas MLC reguladoras. De facto, a partir do 6º dia após a indução de lesão, pudemos verificar um decréscimo acentuado da isoforma MLC3f e um aumento, embora não tão uniforme, da isoforma MLC1f. No entanto, relativamente à isoforma MLC reguladora detectada, i.e., MLC2f, observou-se um comportamento oscilatório ao longo de todo o processo regenerativo. De forma semelhante, estudos desenvolvidos por Wada *et al.* (2003) e por Wahrmann *et al.* (2001) verificaram que a sequência das transformações das isoformas MHCIIIB em MHCIIID/X e destas em MHCIIA eram acompanhadas por um decréscimo da concentração relativa da isoforma MLC3f, após os animais serem submetidos a um protocolo de treino de resistência. Segundo Wada *et al.* (2003), a isoforma MLC3f apresenta maior afinidade para a isoforma MHCIIIB do que para a isoforma MHCIIA, o que poderá justificar os

resultados obtidos no nosso estudo. Efectivamente, a substituição da isoforma MHCIIIB pela isoforma MHCIIA, poderá resultar numa maior quantidade de MLC3f livre, a qual será mais rapidamente degradada e, conseqüentemente, diminuída em concentração relativa. No que diz respeito à expressão da isoforma MLC1f, também Wada *et al.* (2003), observaram um incremento, embora não significativo, desta isoforma após os animais serem submetidos a um protocolo de treino de resistência com a duração de 10 semanas. À semelhança do efectuado por Wada *et al.* (2003), a análise da contribuição da isoforma MLC3f relativamente à totalidade das isoformas MLC alcalinas, pela razão $MLC3f/(MLC3f+MLC1f)$, evidenciou um comportamento idêntico ao verificado para a isoforma MLC3f.

De forma idêntica ao observado relativamente às características das MHC, também a variação do teor de MLC dos animais injectados com colchicina foi bastante atenuada comparativamente ao observado nos animais sem administração de colchicina. Na figura 30, é evidenciado o efeito da colchicina na conservação das características fenotípicas da fibra muscular durante o processo regenerativo avaliado. Deste modo, as alterações qualitativas supra referidas parecem poder atribuir-se, essencialmente, à adição de mionúcleos por parte das CS.

No nosso protocolo experimental, em adição às alterações das isoformas MHC e MLC, foram também observadas variações no perfil metabólico das fibras ao longo do tempo pós lesão. Esta análise, à semelhança do efectuado para as MLC, foi realizada recorrendo à metodologia proteómica por identificação de *spots* em géis 2D. Numa abordagem geral dos géis 2D de proteínas de *gastrocnemius* de animais com e sem colchicina, observou-se uma diminuição de cerca de 10% do número de *spots* nos géis de músculo com colchicina comparativamente aos géis de músculo sem colchicina. A diminuição do número de *spots* nos animais tratados com colchicina poderá estar relacionada com uma diminuição da síntese proteica.

Relativamente às enzimas metabólicas, a análise dos nossos resultados evidencia um incremento, quer da enzima piruvato cinase, quer da enzima enolase. Esta tendência foi minimizada, ou seja, não se observaram alterações no teor destas proteínas, aquando da administração do fármaco inibidor da proliferação celular, como se pode constatar pela análise comparativa das figuras 31A e 31B. Assim sendo, e atendendo aos resultados apresentados na tabela 5 do capítulo 3 (pág 66), estas alterações quantitativas da

expressão de proteínas metabólicas poderão também ser atribuídas à contribuição de células endoteliais e de fibroblastos, para além das células satélite. A contribuição para a expressão de proteínas metabólicas, com particular destaque para a piruvato cinase, por parte dos mionúcleos das fibras diferenciadas parece não ser relevante para as alterações fenotípicas observadas, uma vez que na presença da colchicina não se observaram quaisquer tipos de alterações no perfil desta enzima metabólica (figura 31B).

A pesquisa de outras enzimas metabólicas, sobretudo as características do metabolismo oxidativo, seria uma mais valia no nosso estudo. Contudo, no gel 2D utilizado como padrão de comparação (da *web page*: http://www.expasy.org/cgi-bin/map2/noid?MUSCLE_MOUSE) nenhum dos *spots* identificados até à data correspondeu a enzimas características do metabolismo oxidativo, o que impossibilitou a sua análise. Na realidade, a caracterização proteómica do *gastrocnemius* de ratinho é escassa, talvez porque só recentemente começou a ser explorada. É nosso objectivo futuro complementar a informação existente, identificando alguns *spots* dos géis 2D obtidos neste estudo.

Convém ainda salientar que nas fases iniciais do protocolo experimental, i.e., até aproximadamente ao 4º dia após a indução de lesão, ocorreu uma resposta inflamatória intensa, atendendo aos elevados níveis de actividade da MPO e da NAG apresentados nas figuras 9 e 10 do capítulo 3 (pág 58). Consequentemente, muitas das proteínas associadas a este processo inflamatório, como factores de crescimento, citocinas e proteínas do sistema do complemento, poderão contribuir para o incremento do teor proteico total. Desta forma, os valores de densidade óptica observados para os géis 2D e para as proteínas MHC analisadas nesta fase do processo regenerativo, poderão encontrar-se sob-valorizados uma vez que a quantidade de amostra de músculo analisada foi estimada em função da quantidade de proteína total.

Em suma, com base nos nossos resultados, podemos concluir que as CS e outras células *stem* musculares desempenham um papel fundamental nas alterações fenotípicas observadas no músculo esquelético de ratinho decorrentes de um estímulo traumático.

V. Conclusões

Com base nos resultados dos diferentes estudos que compõem esta dissertação é possível retirar as seguintes conclusões:

i) A metodologia de *South Western* é uma técnica simples e eficaz na marcação de células em proliferação, nomeadamente de células satélite, no tecido muscular esquelético. Apresentando os resultados desta metodologia uma boa correlação com os dados obtidos por imunohistoquímica, esta técnica poderá representar uma alternativa adequada na detecção de células mitoticamente activas.

ii) Estímulos lesivos no músculo esquelético induziram proliferação de células intersticiais de origem não endotelial e de CS com conseqüente aparecimento de núcleos em posição central.

iii) A lesão por esmagamento do músculo esquelético confirmou-se como um modelo experimental eficaz de degeneração e conseqüente regeneração muscular, permitindo o estudo da evolução temporal dos mecanismos fisiopatológicos associados.

Conclusões

iv) As alterações bioquímicas e morfológicas associadas à lesão por esmagamento do músculo *gastrocnemius* sugerem o envolvimento de diferentes mecanismos (proteólise, resposta inflamatória e apoptose) com contribuições distintas no tempo.

v) As alterações ultra-estruturais observadas por microscopia electrónica após lesão por esmagamento do músculo *gastrocnemius* foram acompanhadas por alterações bioquímicas com particular destaque para marcadores de proteólise e inflamatórios.

vi) Os índices elevados de marcadores apoptóticos nas fases iniciais e finais do estudo associados à lesão por esmagamento do músculo *gastrocnemius*, sugerem a ocorrência de fenómenos de morte celular programada em determinados tipos de células.

vii) O aumento da proliferação celular observada nas fases iniciais do processo regenerativo e decorrente da lesão induzida por esmagamento do músculo *gastrocnemius*, parece dever-se essencialmente à contribuição de CS e de células intersticiais não endoteliais.

viii) A colchicina, utilizada como inibidor de proliferação celular, parece constituir-se como um modelo eficaz e alternativo à radiação.

ix) A inibição da proliferação celular por acção da colchicina comprometeu as alterações fenóticas associadas ao processo de degeneração/regeneração motivada pelo trauma, particularmente as das isoformas de MHC e de MLC e as de proteínas metabólicas.

x) As CS e outras células *stem* musculares desempenham um papel fundamental nas alterações fenóticas observadas no músculo esquelético de ratinho decorrentes de um estímulo traumático.

VI. Referências Bibliográficas

1. **Adams GR and Baldwin KM.** Age dependence of myosin heavy chain transitions induced by creatine depletion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 78: 368-371, 1995.
2. **Adams GR, Caiozzo VJ, Haddad F and Baldwin KM.** Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1182-1195, 2002.
3. **Adams GR and Haddad F.** The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 81: 2509-2516, 1996.
4. **Adams GR, Hather BM, Baldwin KM and Dudley GA.** Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 74: 911-915, 1993.
5. **Adams GR and McCue SA.** Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 84: 1716-1722, 1998.
6. **Adhihetty PJ and Hood DA.** Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 13: 171-179, 2003.
7. **Allen DL, Harrison BC and Leinwand LA.** Inactivation of myosin heavy chain genes in the mouse: diverse and unexpected phenotypes. *Microsc Res Tech* 50: 492-499, 2000.
8. **Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC and Leinwand LA.** Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* 90: 1900-1908, 2001.

9. **Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR.** Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 78: 1969-1976, 1995.
10. **Allen DL, Roy RR and Edgerton VR.** Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22: 1350-1360, 1999.
11. **Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR and Edgerton VR.** Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol* 81: 145-151, 1996.
12. **Allen RE and Rankin LL.** Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development. *Proc Soc Exp Biol Med* 194: 81-86, 1990.
13. **Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G and Smith CA.** Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C66-76, 2002.
14. **Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, Chaudhrai A and Murlasits ZS.** Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R540-549, 2003.
15. **Andersen JL, Terzis G and Kryger A.** Increase in the degree of coexpression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle fibers of the very old. *Muscle Nerve* 22: 449-454, 1999.
16. **Appell HJ, Forsberg S and Hollmann W.** Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med* 9: 297-299, 1988.
17. **Appell HJ, Soares JM and Duarte JA.** Exercise, muscle damage and fatigue. *Sports Med* 13: 108-115, 1992.
18. **Armand AS, Launay T, Gaspera BD, Charbonnier F, Gallien CL and Chanoine C.** Effects of eccentric treadmill running on mouse soleus: degeneration/regeneration studied with Myf-5 and MyoD probes. *Acta Physiol Scand* 179: 75-84, 2003.
19. **Armstrong RB, Warren GL and Warren JA.** Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 12: 184-207, 1991.
20. **Arnhold J.** Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)* 69: 4-9, 2004.
21. **Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA and Goodyear LJ.** Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 99: 1251-1257, 1997.
22. **Asakura A.** Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med* 13: 123-128, 2003.
23. **Asakura A, Komaki M and Rudnicki M.** Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68: 245-253, 2001.

24. **Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A and Rudnicki MA.** Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159: 123-134, 2002.
25. **Baldwin KM and Haddad F.** Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 90: 345-357, 2001.
26. **Baldwin KM and Haddad F.** Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S40-51, 2002.
27. **Barjot C, Rouanet P, Vigneron P, Janmot C, d'Albis A and Bacou F.** Transformation of slow- or fast-twitch rabbit muscles after cross-reinnervation or low frequency stimulation does not alter the in vitro properties of their satellite cells. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 25-32, 1998.
28. **Barnoy S, Glasner T and Kosower NS.** The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 933-938, 1996.
29. **Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA and Zammit PS.** Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151: 1221-1234, 2000.
30. **Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J and Panjabi MM.** The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med* 27: 2-9, 1999.
31. **Belcastro AN, Shewchuk LD and Raj DA.** Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 179: 135-145, 1998.
32. **Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V and Ventura-Clapier R.** Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem* 275: 19653-19660, 2000.
33. **Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC and D'Albis A.** Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* 81: 2658-2665, 1996.
34. **Bischoff R.** Control of satellite cell proliferation. *Adv Exp Med Biol* 280: 147-157; discussion 157-148, 1990.
35. **Bischoff R.** Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 208: 505-515, 1997.
36. **Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP and Epstein JA.** Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development* 126: 1665-1674, 1999.
37. **Bottinelli R and Reggiani C.** Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 195-262, 2000.
38. **Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y and Reggiani C.** Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C575-583, 2003.

39. **Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL and Best TM.** Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 33: 2010-2015, 2001.
40. **Brotchie D, Davies I, Ireland G and Mahon M.** Dual-channel laser scanning microscopy for the identification and quantification of proliferating skeletal muscle satellite cells following synergist ablation. *J Anat* 186 (Pt 1): 97-102, 1995.
41. **Brown SB and Savill J.** Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* 162: 480-485, 1999.
42. **Buckingham M.** Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11: 440-448, 2001.
43. **Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D and Relaix F.** The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202: 59-68, 2003.
44. **Caiozzo VJ, Baker MJ and Baldwin KM.** Modulation of myosin isoform expression by mechanical loading: role of stimulation frequency. *J Appl Physiol* 82: 211-218, 1997.
45. **Carlsen H and Gundersen K.** Helix-loop-helix transcription factors in electrically active and inactive skeletal muscles. *Muscle Nerve* 23: 1374-1380, 2000.
46. **Carlson BM.** Regeneration of entire skeletal muscles. *Fed Proc* 45: 1456-1460, 1986.
47. **Carlson BM.** Regeneration of muscle. *Encyclopedia of life sciences*: 1-6, 2001.
48. **Carlson BM.** Muscle regeneration in amphibians and mammals: passing the torch. *Dev Dyn* 226: 167-181, 2003.
49. **Carson JA and Alway SE.** Stretch overload-induced satellite cell activation in slow tonic muscle from adult and aged Japanese quail. *Am J Physiol* 270: C578-584, 1996.
50. **Chakravarthy MV, Davis BS and Booth FW.** IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89: 1365-1379, 2000.
51. **Chambers RL and McDermott JC.** Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol* 21: 155-184, 1996.
52. **Charge SB and Rudnicki MA.** Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238, 2004.
53. **Chen JC and Goldhamer DJ.** Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 101, 2003.
54. **Child R, Brown S, Day S, Donnelly A, Roper H and Saxton J.** Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci (Lond)* 96: 105-115, 1999.
55. **Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R and Williams RS.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12: 2499-2509, 1998.

56. **Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M and Butler-Browne GS.** In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 112 (Pt 17): 2895-2901, 1999.
57. **Cornelison DD and Wold BJ.** Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 191: 270-283, 1997.
58. **Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS and Slack RS.** Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19: 7860-7869, 1999.
59. **Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD and Panjabi MM.** A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 22: 702-710, 1994.
60. **Cuenda A and Cohen P.** Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* 274: 4341-4346, 1999.
61. **Darr KC and Schultz E.** Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J Appl Physiol* 63: 1816-1821, 1987.
62. **Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A and Carlson BM.** Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem* 51: 853-863, 2003.
63. **Dee K, Freer M, Mei Y and Weyman CM.** Apoptosis coincident with the differentiation of skeletal myoblasts is delayed by caspase 3 inhibition and abrogated by MEK-independent constitutive Ras signaling. *Cell Death Differ* 9: 209-218, 2002.
64. **Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M and Coombes JS.** Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86: 1002-1008, 1999.
65. **Devor ST and Faulkner JA.** Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury. *J Appl Physiol* 87: 750-756, 1999.
66. **Dietrich S, Abou-Rebyeh F, Brohmann H, Bladt F, Sonnenberg-Riethmacher E, Yamaai T, Lumsden A, Brand-Saberi B and Birchmeier C.** The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* 126: 1621-1629, 1999.
67. **Dominov JA, Dunn JJ and Miller JB.** Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J Cell Biol* 142: 537-544, 1998.
68. **Duarte JA.** *Miopatia do exercício. Alterações morfológicas no músculo esquelético do ratinho sujeito a dois protocolos diferentes de corrida* (Provas de aptidão científica e de capacidade pedagógica): Universidade do Porto, 1989.
69. **Duarte JA.** *Lesões celulares do musculo esquelético induzidas pelo exercício físico* (Tese de Doutoramento): Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física, Universidade do Porto, 1993.

70. **Duarte JA, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM and Appell HJ.** Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68: 48-53, 1994.
71. **Duarte JA, Soares JM and Appell HJ.** Nifedipine diminishes exercise-induced muscle damage in mouse. *Int J Sports Med* 13: 274-277, 1992.
72. **Dupont-Versteegden EE, Murphy RJ, Houle JD, Gurley CM and Peterson CA.** Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats. *Am J Physiol* 277: C589-597, 1999.
73. **Ebbeling CB and Clarkson PM.** Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 7: 207-234, 1989.
74. **Esser KA and White TP.** Mechanical load affects growth and maturation of skeletal muscle grafts. *J Appl Physiol* 78: 30-37, 1995.
75. **Farges MC, Balcerzak D, Fisher BD, Attaix D, Bechet D, Ferrara M and Baracos VE.** Increased muscle proteolysis after local trauma mainly reflects macrophage-associated lysosomal proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E326-335, 2002.
76. **Fernandez AM, Dupont J, Farrar RP, Lee S, Stannard B and Le Roith D.** Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. *J Clin Invest* 109: 347-355, 2002.
77. **Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS and Megeney LA.** Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11025-11030, 2002.
78. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530, 1998.
79. **Ferry A, Noirez P, Salah IB, Le Page C, Wahrman JP and Rieu M.** Effect of increased physical activity on growth and differentiation of regenerating rat soleus muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 76: 270-276, 1997.
80. **Fink E, Fortin D, Serrurier B, Ventura-Clapier R and Bigard AX.** Recovery of contractile and metabolic phenotypes in regenerating slow muscle after notexin-induced or crush injury. *J Muscle Res Cell Motil* 24: 421-429, 2003.
81. **Fisher BD, Renne S, Warren S, Magee D and Koh J.** The effects of low power laser therapy on muscle healing following acute blunt trauma. *J. Phys. Ther. Sci* 12: 49-55, 2000.
82. **Fluck M and Hoppeler H.** Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 159-216, 2003.
83. **Friden J and Lieber RL.** Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell Tissue Res* 293: 165-171, 1998.

84. **Gao X, Chandra T, Gratton MO, Quelo I, Prud'homme J, Stifani S and St-Arnaud R.** HES6 acts as a transcriptional repressor in myoblasts and can induce the myogenic differentiation program. *J Cell Biol* 154: 1161-1171, 2001.
85. **Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R and Williams RS.** Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol* 188: 280-294, 1997.
86. **Gibala MJ, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Stauber WT and Elorriaga A.** Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J Appl Physiol* 78: 702-708, 1995.
87. **Gleeson M, Almey J, Brooks S, Cave R, Lewis A and Griffiths H.** Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 71: 137-142, 1995.
88. **Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA and Garry DJ.** Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 14: 261-271, 2003.
89. **Goldring K, Partridge T and Watt D.** Muscle stem cells. *J Pathol* 197: 457-467, 2002.
90. **Goli DE, Thompson VF, Li H, Wei W and Cong J.** The Calpain System. *Physiol. Rev* 83: 731-801, 2002.
91. **Gonzalez B, Negredo P, Hernando R and Manso R.** Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflugers Arch* 443: 377-386, 2002.
92. **Gregorevic P, Williams DA and Lynch GS.** Effects of leukemia inhibitory factor on rat skeletal muscles are modulated by clenbuterol. *Muscle Nerve* 25: 194-201, 2002.
93. **Grounds MD.** Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 3: 19-24, 2002.
94. **Haddad F and Adams GR.** Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol* 96: 203-210, 2004.
95. **Haddad F, Arnold C, Zeng M and Baldwin K.** Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve* 20: 1487-1496, 1997.
96. **Haider SR, Juan G, Traganos F and Darzynkiewicz Z.** Immunoseparation and immunodetection of nucleic acids labeled with halogenated nucleotides. *Exp Cell Res* 234: 498-506, 1997.
97. **Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017, 1998.
98. **Harris JB.** Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42: 933-945, 2003.

99. **Hawke TJ and Garry DJ.** Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551, 2001.
100. **Hill M, Wernig A and Goldspink G.** Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat* 203: 89-99, 2003.
101. **Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G and Cinti S.** Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C670-681, 2000.
102. **Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ and Konieczny SF.** Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol* 147: 144-156, 1991.
103. **Hollnagel A, Grund C, Franke WW and Arnold HH.** The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* 22: 4760-4770, 2002.
104. **Hood DA, Zak R and Pette D.** Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur J Biochem* 179: 275-280, 1989.
105. **Hoppeler H and Fluck M.** Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 205: 2143-2152, 2002.
106. **Howald H, Hoppeler H, Claassen H, Mathieu O and Straub R.** Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch* 403: 369-376, 1985.
107. **Huang J and Forsberg NE.** Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12100-12105, 1998.
108. **Huard J, Cao B and Qu-Petersen Z.** Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 69: 230-237, 2003.
109. **Huard J, Li Y and Fu FH.** Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84-A: 822-832, 2002.
110. **Hughes SM, Chi MM, Lowry OH and Gundersen K.** Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol* 145: 633-642, 1999.
111. **Hurme T and Kalimo H.** Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24: 197-205, 1992.
112. **Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I and Barritault D.** Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 249-258, 1996.
113. **Jackson MJ.** Damage to skeletal muscle during exercise: Relative roles of free radicals and others processes. *Exercise and trainin. Med Sport Sci. Basel, Kargen* 34: 131-139, 1992.

114. **Jacobs SC, Bar PR and Bootsma AL.** Effect of hypothyroidism on satellite cells and postnatal fiber development in the soleus muscle of rat. *Cell Tissue Res* 286: 137-144, 1996.
115. **Jarva J, Alev K and Seene T.** The effect of autografting on the myosin composition in skeletal muscle fibers. *Muscle Nerve* 20: 718-727, 1997.
116. **Jarvis JC, Mokrusch T, Kwende MM, Sutherland H and Salmons S.** Fast-to-slow transformation in stimulated rat muscle. *Muscle Nerve* 19: 1469-1475, 1996.
117. **Jejurikar SS and Kuzon Jr WM.** Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis* 8: 573-578, 2003.
118. **Jordan MA.** Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2: 1-17, 2002.
119. **Jordan MA and Wilson L.** Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4: 253-265, 2004.
120. **Joshi CV and Enver T.** Plasticity revisited. *Curr Opin Cell Biol* 14: 749-755, 2002.
121. **Kadi F and Thornell LE.** Training affects myosin heavy chain phenotype in the trapezius muscle of women. *Histochem Cell Biol* 112: 73-78, 1999.
122. **Kadi F and Thornell LE.** Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochem Cell Biol* 113: 99-103, 2000.
123. **Kami K and Senba E.** In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *J Histochem Cytochem* 50: 1579-1589, 2002.
124. **Kamradt MC, Chen F, Sam S and Cryns VL.** The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277: 38731-38736, 2002.
125. **Keller HL, St Pierre Schneider B, Eppihimer LA and Cannon JG.** Association of IGF-I and IGF-II with myofiber regeneration in vivo. *Muscle Nerve* 22: 347-354, 1999.
126. **Kendrick-Jones J, Hodge TP, Lister IMB, Roberts RC and Buss F.** Myosin superfamily. In: *Encyclopedia of the life science*, 2001, p. 1-8.
127. **Khan MA.** Effects of myotoxins on skeletal muscle fibers. *Prog Neurobiol* 46: 541-560, 1995.
128. **Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA and Liles WC.** Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 185: 1511-1516, 1997.
129. **Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P and Bass J.** Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184: 356-363, 2000.

130. **Klug GA, Botterman BR and Stull JT.** The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 257: 4688-4690, 1982.
131. **Knobloch J, Kunz W and Grevelding CG.** Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Dev Growth Differ* 44: 559-563, 2002.
132. **Kuipers H.** Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med* 15: 132-135, 1994.
133. **Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M and Austin L.** The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve* 20: 815-822, 1997.
134. **Kurek JB, Bower JJ, White JD, Muldoon CM and Austin L.** Leukaemia inhibitory factor and other cytokines as factors. Influencing regeneration of skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 8: 347-360, 1998.
135. **Kuschel R, Yablonka-Reuveni Z and Bornemann A.** Satellite cells on isolated myofibers from normal and denervated adult rat muscle. *J Histochem Cytochem* 47: 1375-1384, 1999.
136. **Kyriakides C, Favuzza J, Wang Y, Austen WG, Jr., Moore FD, Jr. and Hechtman HB.** Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand 1 moderates local and remote injuries following experimental lower-torso ischaemia. *Br J Surg* 88: 825-830, 2001.
137. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
138. **Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL and Grompe M.** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6: 1229-1234, 2000.
139. **Lapointe BM, Frenette J and Cote CH.** Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. *J Appl Physiol* 92: 1995-2004, 2002.
140. **Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D and Weintraub H.** Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66: 305-315, 1991.
141. **Lassar AB, Skapek SX and Novitch B.** Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol* 6: 788-794, 1994.
142. **Lawen A.** Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25: 888-896, 2003.
143. **Lawson-Smith MJ and McGeachie JK.** The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat* 192 (Pt 2): 161-171, 1998.
144. **Leeuw T and Pette D.** Coordinate changes of myosin light and heavy chain isoforms during forced fiber type transitions in rabbit muscle. *Dev Genet* 19: 163-168, 1996.

145. **Lefaucheur JP and Seville A.** The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul Disord* 5: 501-509, 1995.
146. **Lokuta MA, Nuzzi PA and Huttenlocher A.** Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4006-4011, 2003.
147. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
148. **Lyons GE, Ontell M, Cox R, Sassoon D and Buckingham M.** The expression of myosin genes in developing skeletal muscle in the mouse embryo. *J Cell Biol* 111: 1465-1476, 1990.
149. **MacGregor J and Parkhouse WS.** The potential role of insulin-like growth factors in skeletal muscle regeneration. *Can J Appl Physiol* 21: 236-250, 1996.
150. **Machida S, Spangenburg EE and Booth FW.** Forkhead transcription factor FoxO1 transduces insulin-like growth factor's signal to p27Kip1 in primary skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 196: 523-531, 2003.
151. **Magaudda L, Mauro D, Trimarchi F and Anastasi G.** Effects of physical exercise on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14: 17-21, 2004.
152. **Maier A, Zhou Z and Bornemann A.** The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle. *Brain Pathol* 12: 170-177, 2002.
153. **Maier F and Bornemann A.** Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve* 22: 578-583, 1999.
154. **Maley MA, Davies MJ and Grounds MD.** Extracellular matrix, growth factors, genetics: their influence on cell proliferation and myotube formation in primary cultures of adult mouse skeletal muscle. *Exp Cell Res* 219: 169-179, 1995.
155. **Maroto M, Reshef R, Munsterberg AE, Koester S, Goulding M and Lassar AB.** Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 89: 139-148, 1997.
156. **Marsh DR, Criswell DS, Carson JA and Booth FW.** Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J Appl Physiol* 83: 1270-1275, 1997.
157. **Mauro A.** Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495, 1961.
158. **McCormick KM and Thomas DP.** Exercise-induced satellite cell activation in senescent soleus muscle. *J Appl Physiol* 72: 888-893, 1992.
159. **McCutcheon LJ, Byrd SK and Hodgson DR.** Ultrastructural changes in skeletal muscle after fatiguing exercise. *J Appl Physiol* 72: 1111-1117, 1992.

160. **McFarland DC**. Influence of growth factors on poultry myogenic satellite cells. *Poult Sci* 78: 747-758, 1999.
161. **McKinsey TA, Zhang CL and Olson EN**. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 27: 40-47, 2002.
162. **McLoon LK, Nguyen LT and Wirtschafter J**. Time course of the regenerative response in bupivacaine injured orbicularis oculi muscle. *Cell Tissue Res* 294: 439-447, 1998.
163. **McLoon LK, Rowe J, Wirtschafter J and McCormick KM**. Continuous myofiber remodeling in uninjured extraocular myofibers: myonuclear turnover and evidence for apoptosis. *Muscle Nerve* 29: 707-715, 2004.
164. **McPherron AC and Lee SJ**. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12457-12461, 1997.
165. **Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE and Rudnicki MA**. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 10: 1173-1183, 1996.
166. **Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS and Huard J**. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 82: 131-137, 2000.
167. **Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F and Gardahaut MF**. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22: 724-732, 1999.
168. **Merrifield P and Atkinson BG**. Phylogenetic diversity of myosin expression in muscle. *Microsc Res Tech* 50: 425-429, 2000.
169. **Meszaros AJ, Reichner JS and Albina JE**. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 165: 435-441, 2000.
170. **Miller JB, Schaefer L and Dominov JA**. Seeking muscle stem cells. *Curr Top Dev Biol* 43: 191-219, 1999.
171. **Miller KJ, Thaloor D, Matteson S and Pavlath GK**. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C174-181, 2000.
172. **Minamoto VB, Bunho SR and Salvini TF**. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res* 34: 1447-1452, 2001.
173. **Minamoto VB, Grazziano CR and Salvini TF**. Effect of single and periodic contusion on the rat soleus muscle at different stages of regeneration. *Anat Rec* 254: 281-287, 1999.
174. **Mogi M and Togari A**. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 278: 47477-47482, 2003.

175. **Molkentin JD, Black BL, Martin JF and Olson EN.** Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83: 1125-1136, 1995.
176. **Molkentin JD and Olson EN.** Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9366-9373, 1996.
177. **Moore N, Okocha F, Cui JK and Liu PK.** Homogeneous repair of nuclear genes after experimental stroke. *J Neurochem* 80: 111-118, 2002.
178. **Morgan JE and Partridge TA.** Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1151-1156, 2003.
179. **Mozdziak PE, Pulvermacher PM and Schultz E.** Muscle regeneration during hindlimb unloading results in a reduction in muscle size after reloading. *J Appl Physiol* 91: 183-190, 2001.
180. **Mozdziak PE, Pulvermacher PM, Schultz E and Schell K.** Hoechst fluorescence intensity can be used to separate viable bromodeoxyuridine-labeled cells from viable non-bromodeoxyuridine-labeled cells. *Cytometry* 41: 89-95, 2000.
181. **Mozdziak PE, Schultz E and Cassens RG.** The effect of in vivo and in vitro irradiation (25 Gy) on the subsequent in vitro growth of satellite cells. *Cell Tissue Res* 283: 203-208, 1996.
182. **Munsterberg AE and Lassar AB.** Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development* 121: 651-660, 1995.
183. **Nader GA and Esser KA.** Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol* 90: 1936-1942, 2001.
184. **Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS and Olson EN.** Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem* 275: 4545-4548, 2000.
185. **Newham DJ, McPhail G, Mills KR and Edwards RH.** Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle. *J Neurol Sci* 61: 109-122, 1983.
186. **Niinobu T, Fukuo K, Yasuda O, Tsubakimoto M, Mogi M, Nishimaki H, Morimoto S and Ogihara T.** Negative feedback regulation of activated macrophages via Fas-mediated apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C504-509, 2000.
187. **O'Brien K, Muskiewicz K and Gussoni E.** Recent advances in and therapeutic potential of muscle-derived stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 38: 80-87, 2002.
188. **Olive M and Ferrer I.** Bcl-2 and bax immunohistochemistry in denervation-reinnervation and necrosis-regeneration of rat skeletal muscles. *Muscle Nerve* 23: 1862-1867, 2000.
189. **Partridge T.** The role of satellite cells and circulating stem cells in regeneration of skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 13: 277-280, 2003.

190. **Pavlath GK, Thaloor D, Rando TA, Cheong M, English AW and Zheng B.** Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Dev Dyn* 212: 495-508, 1998.
191. **Peng H and Huard J.** Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant immunology* 12: 311-319, 2004.
192. **Pette D.** The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *Can J Appl Physiol* 27: 423-448, 2002.
193. **Pette D, Sketelj J, Skorjanc D, Leisner E, Traub I and Bajrovic F.** Partial fast-to-slow conversion of regenerating rat fast-twitch muscle by chronic low-frequency stimulation. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 215-221, 2002.
194. **Pette D and Staron RS.** Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170: 143-223, 1997.
195. **Pette D and Staron RS.** Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50: 500-509, 2000.
196. **Pette D and Vrbova G.** What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 22: 666-677, 1999.
197. **Phaneuf S and Leeuwenburgh C.** Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 393-396, 2001.
198. **Phelan JN and Gonyea WJ.** Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247: 179-188, 1997.
199. **Phillips GD and Knighton DR.** Skeletal muscle regenerates. *Wounds: A compendium of clinical Research* 2: 82-94, 1990.
200. **Pietsch P.** The effects of colchicine on regeneration of mouse skeletal muscle. *Anatomical Record* 139: 167-172, 1961.
201. **Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ and Brooks SV.** Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol* 92: 1873-1878, 2002.
202. **Pizza FX, McLoughlin TJ, McGregor SJ, Calomeni EP and Gunning WT.** Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C335-341, 2001.
203. **Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K and Carraro U.** Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 518-531, 1998.
204. **Primeau AJ, Adhihetty PJ and Hood DA.** Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 27: 349-395, 2002.
205. **Puri PL and Sartorelli V.** Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol* 185: 155-173, 2000.

206. **Putman CT, Dusterhoft S and Pette D.** Satellite cell proliferation in low frequency-stimulated fast muscle of hypothyroid rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C682-690, 2000.
207. **Putman CT, Sultan KR, Wassmer T, Bamford JA, Skorjanc D and Pette D.** Fiber-type transitions and satellite cell activation in low-frequency-stimulated muscles of young and aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: B510-519, 2001.
208. **Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D and Greenhaff PL.** Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1076-1081, 2000.
209. **Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, Hurme T and Kalimo H.** Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *Am J Sports Med* 27: 54-59, 1999.
210. **Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, DiDonna S, Decary S, Hentati F, Saillant G, Butler-Browne GS and Mouly V.** Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol* 35: 711-719, 2000.
211. **Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F and Pozzan T.** Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22: 8619-8627, 2003.
212. **Rosenblatt JD, Yong D and Parry DJ.** Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve* 17: 608-613, 1994.
213. **Rosser BW and Bandman E.** Heterogeneity of protein expression within muscle fibras. *J. Anim.Sci* 81: E94-E101, 2003.
214. **Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Metter EJ, Hurley BF and Rogers MA.** High-volume, heavy-resistance strength training and muscle damage in young and older women. *J Appl Physiol* 88: 1112-1118, 2000.
215. **Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Hurlbut DE, Metter EJ, Hurley BF and Rogers MA.** Ultrastructural muscle damage in young vs. older men after high-volume, heavy-resistance strength training. *J Appl Physiol* 86: 1833-1840, 1999.
216. **Roy RR, Monke SR, Allen DL and Edgerton VR.** Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol* 87: 634-642, 1999.
217. **Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH and Jaenisch R.** MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359, 1993.
218. **Ruest LB, Khalyfa A and Wang E.** Development-dependent disappearance of caspase-3 in skeletal muscle is post-transcriptionally regulated. *J Cell Biochem* 86: 21-28, 2002a.
219. **Ruest LB, Marcotte R and Wang E.** Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 277: 5418-5425, 2002b.

220. **Rushton JL, Davies I, Horan MA, Mahon M and Williams R.** Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. *J Anat* 190 (Pt 3): 417-422, 1997.
221. **Sabourin LA and Rudnicki MA.** The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57: 16-25, 2000.
222. **Saido TC, Sorimachi H and Suzuki K.** Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *Faseb J* 8: 814-822, 1994.
223. **Saitoh A, Okumoto T, Nakano H, Wada M and Katsuta S.** Age effect on expression of myosin heavy and light chain isoforms in suspended rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 86: 1483-1489, 1999.
224. **Salminen A.** Lysosomal changes in skeletal muscle during the repair of exercise injuries in muscle fibers. *Acta Physiol Scand* S-539, 1985.
225. **Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** *Molecular Cloning. A laboratory manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
226. **Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D and Franceschi C.** Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Lett* 373: 291-295, 1995.
227. **Sandri M, Rossini K, Podhorska-Okolov M and Carraro U.** Role of apoptosis in muscle disorders. *Basic Appl Myol* 9: 301-310, 1999.
228. **Sandri M, Sandri C, Brun B, Giurisato E, Cantini M, Rossini K, Destro C, Arslan P and Carraro U.** Inhibition of fasL sustains phagocytic cells and delays myogenesis in regenerating muscle fibers. *J Leukoc Biol* 69: 482-489, 2001.
229. **Schiaffino S and Reggiani C.** Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 76: 371-423, 1996.
230. **Schmalbruch H and Lewis DM.** Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23: 617-626, 2000.
231. **Schultz E.** Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration. *Med Sci Sports Exerc* 21: S181-186, 1989.
232. **Schultz E.** Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175: 84-94, 1996.
233. **Schultz E, Darr KC and Macius A.** Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle. *J Appl Physiol* 76: 266-270, 1994.
234. **Schultz E and McCormick KM.** Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123: 213-257, 1994.
235. **Scott W, Stevens J and Binder-Macleod SA.** Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81: 1810-1816, 2001.

236. **Seale P and Rudnicki MA.** A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124, 2000.
237. **Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P and Rudnicki MA.** Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786, 2000.
238. **Sedmak JJ and Grossberg SE.** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79: 544-552, 1977.
239. **Sellers WR, Novitch BG, Miyake S, Heith A, Otterson GA, Kaye FJ, Lassar AB and Kaelin WG, Jr.** Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev* 12: 95-106, 1998.
240. **Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA and Swoap SJ.** bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C408-413, 2001.
241. **Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U and Halevy O.** Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 115: 1461-1469, 2002.
242. **Shen X, Collier JM, Hlaing M, Zhang L, Delshad EH, Bristow J and Bernstein HS.** Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation. *Dev Dyn* 226: 128-138, 2003.
243. **Shiokawa D, Kobayashi T and Tanuma S.** Involvement of DNase gamma in apoptosis associated with myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 277: 31031-31037, 2002.
244. **Skorjanc D, Traub I and Pette D.** Identical responses of fast muscle to sustained activity by low-frequency stimulation in young and aging rats. *J Appl Physiol* 85: 437-441, 1998.
245. **Smith CK, 2nd, Janney MJ and Allen RE.** Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159: 379-385, 1994.
246. **Smith HK, Maxwell L, Rodgers CD, McKee NH and Plyley MJ.** Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1407-1414, 2001.
247. **Smith HK, Plyley MJ, Rodgers CD and McKee NH.** Expression of developmental myosin and morphological characteristics in adult rat skeletal muscle following exercise-induced injury. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80: 84-91, 1999.
248. **Soares JMC and Duarte JA.** Effects of training and an anabolic steroid on murine red skeletal muscle. *Acta Anat* 142: 183-187, 1991.
249. **Sorimachi H, Ishiura S and Suzuki K.** Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 328 (Pt 3): 721-732, 1997.

250. **Spangenburg EE and Booth FW.** Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 178: 413-424, 2003.
251. **Stevens L, Bastide B, Bozzo C and Mounier Y.** Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch* 448: 507-514, 2004.
252. **Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y and Pette D.** Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1558-1563, 2000.
253. **Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y and Pette D.** Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol* 277: C1044-1049, 1999.
254. **Stockdale FE.** Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154: 284-298, 1992.
255. **Stupka N, Tarnopolsky MA, Yardley NJ and Phillips SM.** Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 91: 1669-1678, 2001.
256. **Sugiura T, Matoba H, Miyata H, Kawai Y and Murakami N.** Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol Scand* 144: 419-423, 1992.
257. **Sullivan VK, Powers SK, Criswell DS, Tumer N, Larochelle JS and Lowenthal D.** Myosin heavy chain composition in young and old rat skeletal muscle: effects of endurance exercise. *J Appl Physiol* 78: 2115-2120, 1995.
258. **Sultan KR, Dittrich BT and Pette D.** Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C639-647, 2000.
259. **Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K and Yamaya K.** Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 81: 1213-1222, 1996.
260. **Swoap SJ, Hunter RB, Stevenson EJ, Felton HM, Kansagra NV, Lang JM, Esser KA and Kandarian SC.** The calcineurin-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C915-924, 2000.
261. **Tajbakhsh S.** Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Curr Opin Genet Dev* 13: 413-422, 2003.
262. **Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G and Buckingham M.** Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127-138, 1997.
263. **Takahashi M, Miyamura H, Eguchi S and Homma S.** The effect of bupivacaine hydrochloride on skeletal muscle fiber type transformation by low frequency electrical stimulation. *Neurosci Lett* 155: 191-194, 1993.

264. **Talmadge RJ**. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 23: 661-679, 2000.
265. **Talmadge RJ and Roy RR**. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75: 2337-2340, 1993.
266. **Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR**. Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats. *J Appl Physiol* 78: 1256-1265, 1995.
267. **Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR**. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J Appl Physiol* 81: 2540-2546, 1996.
268. **Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR and Edgerton VR**. New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal growth. *J Histochem Cytochem* 50: 1097-1111, 2002.
269. **Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE and Allen RE**. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 13: 2909-2918, 2002.
270. **Thornell LE, Lindstrom M, Renault V, Mouly V and Butler-Browne GS**. Satellite cells and training in the elderly. *Scand J Med Sci Sports* 13: 48-55, 2003.
271. **Tidball JG**. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R345-353, 2005.
272. **Tidball JG and St Pierre BA**. Apoptosis of macrophages during the resolution of muscle inflammation. *J Leukoc Biol* 59: 380-388, 1996.
273. **Torgan CE and Daniels MP**. Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. *Mol Biol Cell* 12: 1499-1508, 2001.
274. **Umnova MM and Seene TP**. The effect of increased functional load on the activation of satellite cells in the skeletal muscle of adult rats. *Int J Sports Med* 12: 501-504, 1991.
275. **Vierck J, O'Reilly B, Hossner K, Antonio J, Byrne K, Bucci L and Dodson M**. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell Biol Int* 24: 263-272, 2000.
276. **Vihko V, Rantamaki J and Salminen A**. Exhaustive physical exercise and acid hydrolase activity in mouse skeletal muscle. A histochemical study. *Histochemistry* 57: 237-249, 1978.
277. **Villena J and Brandan E**. Dermatan sulfate exerts an enhanced growth factor response on skeletal muscle satellite cell proliferation and migration. *J Cell Physiol* 198: 169-178, 2004.
278. **Wackerhage H and Woods NM**. Exercise-induced signal transduction and gene regulation in skeletal muscle. *Journal of Sports Science and Medicine* 4: 103-114, 2002.

279. **Wada M, Inashima S, Yamada T and Matsunaga S.** Endurance training-induced changes in alkali light chain patterns in type IIB fibers of the rat. *J Appl Physiol* 94: 923-929, 2003.
280. **Wada M and Pette D.** Relationships between alkali light-chain complement and myosin heavy-chain isoforms in single fast-twitch fibers of rat and rabbit. *Eur J Biochem* 214: 157-161, 1993.
281. **Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S and Hashimoto N.** Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129: 2987-2995, 2002.
282. **Wahrmann JP, Winand R and Rieu M.** Plasticity of skeletal myosin in endurance-trained rats (I). A quantitative study. *Eur J Appl Physiol* 84: 367-372, 2001.
283. **Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J and Olson EN.** The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128: 4623-4633, 2001.
284. **Wehrle U, Dusterhoft S and Pette D.** Effects of chronic electrical stimulation on myosin heavy chain expression in satellite cell cultures derived from rat muscles of different fiber-type composition. *Differentiation* 58: 37-46, 1994.
285. **Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS and Sesodia S.** Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 141: 24-40, 1990.
286. **White JD, Rachel C, Vermeulen R, Davies M and Grounds MD.** The role of p53 in vivo during skeletal muscle post-natal development and regeneration: studies in p53 knockout mice. *Int J Dev Biol* 46: 577-582, 2002.
287. **Williamson DL, Godard MP, Porter DA, Costill DL and Trappe SW.** Progressive resistance training reduces myosin heavy chain coexpression in single muscle fibers from older men. *J Appl Physiol* 88: 627-633, 2000.
288. **Winchester PK and Gonyea WJ.** Regional injury and the terminal differentiation of satellite cells in stretched avian slow tonic muscle. *Dev Biol* 151: 459-472, 1992.
289. **Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O and Anderson JE.** Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve* 31: 283-300, 2005.
290. **Wright WE, Sassoon DA and Lin VK.** Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617, 1989.
291. **Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P and Mir LM.** Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med* 25: 582-587, 2004.
292. **Wu H, Gallardo T, Olson EN, Williams RS and Shoet RV.** Transcriptional analysis of mouse skeletal myofiber diversity and adaptation to endurance exercise. *J Muscle Res Cell Motil* 24: 587-592, 2003.

293. **Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH and Dunn MJ.** A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21: 3666-3672, 2000.
294. **Yu M, Stepto NK, Chibalin AV, Fryer LG, Carling D, Krook A, Hawley JA and Zierath JR.** Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise. *J Physiol* 546: 327-335, 2003.
295. **Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L and Brunk UT.** Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6286-6291, 2002.
296. **Zammit P and Beauchamp J.** The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68: 193-204, 2001.
297. **Zhang JM, Wei Q, Zhao X and Paterson BM.** Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *Embo J* 18: 926-933, 1999.
298. **Zhao P and Hoffman EP.** Embryonic myogenesis pathways in muscle regeneration. *Dev Dyn* 229: 380-392, 2004.
299. **Zimowska M, Szczepankowska D, Streminska W, Papy D, Tournaire MC, Gautron J, Barritault D, Moraczewski J and Martelly I.** Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration. *J Cell Physiol* 188: 178-187, 2001.
300. **Zubair AC, Silberstein L and Ritz J.** Adult hematopoietic stem cell plasticity. *Transfusion* 42: 1096-1101, 2002.