

ADAPTAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E RESPOSTAS MOLECULARES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO AERÓBIO

IVAN JOSÉ VECHETTI JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Dra. Maeli Dal Pai Silva

Botucatu - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CAMPUS DE BOTUCATU

**ADAPTAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E RESPOSTAS
MOLECULARES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS
SUBMETIDOS AO TREINAMENTO AERÓBIO**

IVAN JOSÉ VECHETTI JÚNIOR

Orientadora: Dra. MAELI DAL PAI SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em
Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: *Dra. Maeli Dal Pai Silva*

Botucatu - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SELMA MARIA DE JESUS*

Vechetti Júnior, I.J.

Adaptações morfofuncionais e respostas moleculares do músculo esquelético de ratos submetidos ao treinamento aeróbio / Ivan José Vechetti Júnior. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Maeli Dal Pai Silva

Capes: 20703007

1. Exercícios aeróbicos - Estudos experimentais. 2. Biologia molecular.

Palavras-chave: Calcineurina; IGF-I; Miostatina; Músculo Esquelético; Treinamento Aeróbio.

Dedicatória

“Dedico este trabalho a minha namorada Daniele Capelin da Silva que sempre me apoiou para que este objetivo fosse alcançado e que soube entender a minha ausência em vários momentos durante esta jornada. Sou imensamente grato por todo amor, carinho, amizade, incentivo e companheirismo que tem me dado todos estes anos que estamos juntos. Obrigado por tudo...”

Agradecimentos

Este trabalho não foi uma caminhada breve, mas uma travessia repleta de percalços que só foram superados graças a muito trabalho e ajuda de várias pessoas que colaboraram direta ou indiretamente. Esta colaboração, não se restringe apenas à relação científica e prática, mas também a um sorriso, um incentivo, um conselho, uma palavra de motivação, uma conversa, uma compreensão, etc... Quero agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que se preocuparam, que foram solidárias, que torceram por mim. Mas bem sei que agradecer é sempre difícil. Posso cometer mais injustiças esquecendo pessoas que me ajudaram do que fazer jus a todas que merecem. Espero não ter me esquecido de ninguém.

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada é possível. Obrigado por sempre guiar os meus passos, me amparar nos momentos difíceis, mostrar os caminhos nas horas incertas e me proteger sempre.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pois confiou na minha capacidade e nos frutos deste projeto. Nossas conversas foram sempre muito esclarecedoras e colaboraram imensamente para a solução dos problemas com que me deparei ao longo desta jornada. Estes dois anos foram valiosos para a minha formação e isto jamais será perdido. Muito, obrigado!

Agradeço a minha namorada Daniele Capelin da Silva por todo seu amor, carinho, amizade e cumplicidade em todos esses anos que estamos juntos. Obrigado pelos sacrifícios a que esta dissertação a obrigaram e por me dar forças nos momentos de fraqueza. Te amo.

Agradeço imensamente aos meus pais Ivan José Vechetti e Aparecida Assumpção Vechetti que, em nenhum momento, mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Obrigado por me conduzirem, ensinando como seguir o melhor caminho, sem precisar transpor as amizades e o respeito para com as outras pessoas.

Agradeço a minha irmã Amanda Vechetti que de forma indireta, porém não menos importante, me apoiou durante a realização deste trabalho; Agradeço também minha sobrinha Ana Clara Vechetti Texeira que apesar de muito nova me ajudou com seu sorriso sincero e sua alegria contagiante. Desejo que Deus continue abençoando vocês.

Agradeço também aos meus amigos Paulo, Pedro e Juliane que mesmo sem contribuir diretamente para a pesquisa, me apoiaram nos momentos difíceis e me fizeram sair de casa, conversar e acima de tudo entenderam minha ausência durante este período. Muitíssimo obrigado.

Agradeço meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME): Airton, Aline, Andreo, Bruno, Caroline, Cassiane, Edson, Eduardo, Fernanda Carani, Fernanda Alves, Fernanda Losi, Flávia, Henrique, Jason, Juliana, Luana, Leonardo, Ludmila, Paula, Paulo, Rachel, Raquel, Robson, Rodrigo e Warlen pelo convívio agradável, conhecimento compartilhado e constante apoio.

Gostaria de agradecer de maneira especial alguns membros do grupo LBME que foram imprescindíveis para que este trabalho fosse concluído. Sem a enorme ajuda de vocês não acabaria esta dissertação. Muito obrigado Andreo Fernando Aguiar, Rodrigo Wagner Alves de Souza, Henrique Borgatto de Almeida Dias, Fernanda Losi Alves de Almeida, Fernanda Regina Carani e Raquel Santilone Bertaglia.

Agradeço ao José Eduardo e Ricardo Teixeira, funcionários do Departamento de Morfologia, pela dedicação, amizade e auxílio prestado com muito bom humor e sinceridade aos discentes do Departamento.

Agradeço aos professores Doutor Bruno César Schimming e Doutor Mário Mateus Sugizaki que me auxiliaram no início desta jornada.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Morfologia (UNESP/IBB/Botucatu), que participaram, positivamente, na minha formação acadêmico-científica.

Agradeço a Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, pela competência na organização e colaboração prestada, durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de SP por financiar este trabalho e acreditar em nosso potencial (processo nº 2009/01623-6 and 2009/53004-8).

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract	10
I - INTRODUÇÃO	12
1. Características Gerais das fibras do Músculo Esquelético	12
2. Modulação das Fibras Musculares ao Treinamento Aeróbio	15
3. Mecanismos Moleculares Envolvidos na Modulação das Fibras Musculares	18
4. Mecanismos Envolvidos no Controle do Fenótipo Muscular	23
II - JUSTIFICATIVA	25
III - OBJETIVOS	25
IV – MATERIAIS E MÉTODOS	25
V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
VI – CAPÍTULO	44

Resumo

O músculo esquelético é constituído por tipos de fibras que diferem de acordo com suas propriedades contráteis e metabólicas. Estas fibras possuem uma elevada plasticidade sendo capazes de alterar seu fenótipo em resposta a vários estímulos, como o treinamento físico. Tem sido demonstrado que o treinamento aeróbico frequentemente induz a pequenas alterações na massa muscular, promovendo mudanças no perfil do músculo em direção a um padrão mais eficiente. Vários estudos têm sido realizados para tentar identificar as vias moleculares envolvidas com a adaptação muscular. A maioria destes estudos tem procurado entender os fatores que controlam as alterações no fenótipo muscular, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), a miostatina (MSTN) e a calcineurina (CaN). O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que as alterações que ocorrem em músculos fenotipicamente distintos durante o treinamento aeróbico de longo prazo são regulados por fatores de crescimento miogênicos, como o IGF-I, MSTN e CaN A e B. Ratos Wistar machos (80 dias de idade, 250-300 g) foram divididos em dois grupos: treinado (T; n = 8) e controle (C, n = 8). Os animais do grupo T foram submetidos a um programa de treinamento aeróbico de natação de longo prazo (8 semanas, 5 dias / semana). O volume e intensidade do treino foram progressivos: 10 min, sem sobrecarga (1ª semana), 20 min, com sobrecarga de 1% (2ª semana), 25, 30, 35 e 40 min, 3% de sobrecarga (3ª semana), 45, 50, 55, e 60 min, 5% de sobrecarga (4ª semana) e 60 min, 5% de sobrecarga (5ª a 8 semanas). No final do experimento os animais foram pesados e sacrificados. Os músculos sóleo (SOL) e Plantar (PL) foram retirados e processados para as análises histoquímica, morfométrica, bioquímica e molecular. Os animais iniciaram o experimento com nenhuma diferença significativa no peso corporal entre os grupos ($p > 0,05$). Após o treinamento, foi observada redução do peso corporal final nos animais do grupo T em comparação com o grupo C ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na área de secção transversal (AST) das fibras musculares no grupo T em relação ao grupo C ($p > 0,05$). No músculo PL, houve um aumento na frequência das fibras do tipo IIA e redução na frequência das fibras do tipo IIB em relação ao grupo C ($p < 0,05$). No músculo SOL, o treinamento promoveu redução significativa na frequência das fibras tipo I e aumento na frequência das fibras do tipo IIA ($p < 0,05$). O treinamento não promoveu alteração na expressão do IGF-I, MSTN e CaN A e B nos músculos SOL e PL entre os grupos ($p > 0,05$). Comparando a expressão protéica da CaN A entre os músculos estudados, houve maior expressão no músculo SOL em ambos os grupos. Concluímos que a CaN A regula

diferencialmente músculos com fenótipos distintos; o treinamento aeróbio de longo prazo não induz hipertrofia muscular e não altera a expressão do IGF-I e MSTN. Estes fatores de crescimento miogênicos estão mais envolvidos no controle da massa muscular do que com a mudança do fenótipo muscular durante o treinamento aeróbio de longo prazo.

Abstract

The skeletal muscle is constituted by fiber types which differ according to their contractile and metabolic properties. Muscle fibers have a high plasticity and are dynamic structures liable to modify their phenotype in response to several stimuli, such as physical training. It has been shown that aerobic training frequently leads to minor changes in muscle mass, promoting changes in muscle profile toward a more efficient pattern. Several studies have been performed to try to identify the molecular pathways involved in the muscle adaptation. Most of them converge to understand the factors that control the muscle phenotype changes including the insulin-like growth factor-I (IGF-I), Myostatin (MSTN) and Calcineurin (CaN). The purpose of this study was to test the hypothesis that muscle phenotypically distinct changes that occur during long-term aerobic training are regulated by myogenic growth factors including IGF-I, MSTN and CaN A and B. Male *Wistar* rats (80 days old, 250-300 g) were divided into two groups: trained (T; n=8) and control (C; n=8). T group underwent a swimming aerobic training program for 8 weeks (5 days/week). Training volume and intensity were progressive: 10 min without overloading (1st week), 20 min, 1% overload (2nd week), 25, 30, 35, and 40 min, 3% overload (3rd week), 45, 50, 55, and 60 min, 5% overload (4th week and 60 min, 5% overload (5th to 8th weeks). At the end of the experiment animals were weighed and sacrificed. Soleus (SOL) and Plantaris (PL) muscles were removed and processed for histochemical, morphometrical, biochemical and molecular analyses. No significant difference was observed in the initial body weight among the groups ($p > 0.05$). After aerobic training, a reduction of the final body weight was observed in the trained ($p < 0.05$) compared with the control groups. There was no significant difference ($p > 0.05$) in muscle fiber cross sectional area (CSA) in both muscles comparing T with C groups. In PL muscle, there was a significant ($p < 0.05$) increase in the type IIA and reduction of type IIB fibers frequencies in T compared to C groups. In SOL muscle, the aerobic training promoted significant reduction ($p < 0.05$) in type I fibers with an increase in type IIA fibers frequencies in T compared to C groups. Long-term aerobic training did not induce significant changes ($p > 0.05$) in CaN A, CaN B, MSTN and IGF-1 expression in SOL and PL muscles between the groups. Comparing the CaN A protein expression between SOL and PL muscles, in SOL, the expression was higher. Based on the results of the current study, we conclude that CaN A differentially regulates slow and fast muscle phenotype. Moreover, the training program adopted did not induce muscle hypertrophy and did not alter CaN, IGF-I and MSTN

expression. These myogenic growth factors are closely related to the control of the muscle mass, more than with muscle phenotype in response to long-term aerobic training.

I – INTRODUÇÃO

1. Características Gerais das Fibras do Músculo Esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido complexo, versátil e heterogêneo, constituído por células multinucleadas especializadas, as fibras musculares, que apresentam mionúcleos localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (Figura 1A). Morfológicamente, as fibras musculares são constituídas por unidades contráteis repetidas, os sarcômeros (Huxley, 1969). Cada sarcômero é formado por várias proteínas, das quais se destacam as proteínas contráteis miosina (filamento grosso formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II) e actina (filamento fino associado às proteínas reguladoras troponina e tropomiosina). A miosina é um hexâmero formado por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas (MHC), enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves (*myosin light chain*, MLC) (Lowey et al., 1969; Weeds & Lowey, 1971; Elliott & Offer, 1978) (Figura 1B). Cada MHC pode ser separada em duas porções: meromiosina leve (*light meromyosin*, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (*heavy meromyosin*, HMM), conhecida como porção globular da miosina, que contém um sítio de interação com a actina e uma região de ligação com a molécula de ATP (com atividade ATPase) (Huxley, 1969; Lowey et al., 1969) (Figura 1B). A contração muscular ocorre através da interação entre os filamentos finos (actina) e grossos (porção globular da molécula de miosina) do sarcômero (Huxley, 1969), após a hidrólise do ATP, pela ATPase miofibrilar (mATPase) (Lowey et al., 1969). A porção globular da MHC representa o componente essencial para o mecanismo de geração de força do músculo.

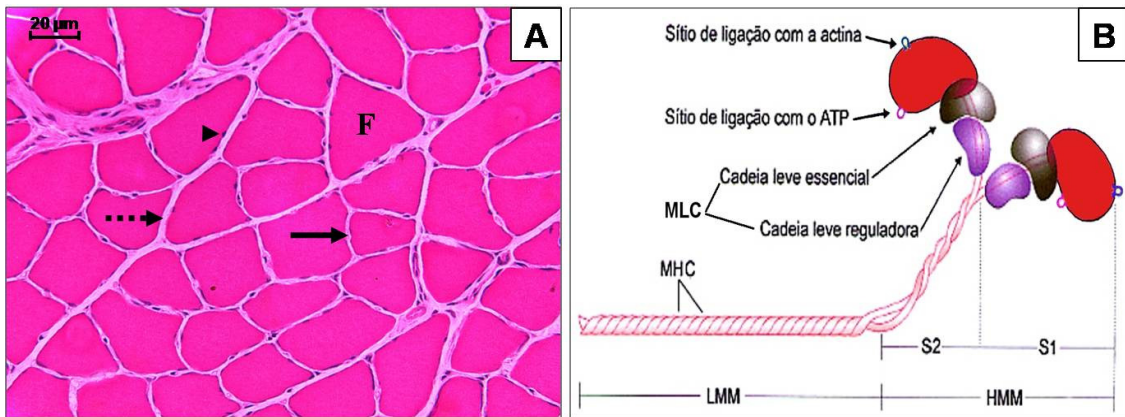


Figura 1. A: Corte transversal do músculo sóleo de rato submetido a coloração HE. Fibras musculares (F); Perimísio (seta descontínua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). B: Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas em meromiosina leves (LMM) e pesadas (HMM). As HMM são formadas pela porção globosa S1 e porção α hélice S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Adaptado de Dal Pai-Silva et al., 2005).

Segundo Talmadge & Roy (1993), a velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional a atividade da mATPase, na porção globular da miosina. Este evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da cadeia pesada da miosina, do inglês *myosin heavy chain* (MHC) (Barany, 1967; Pette & Staron, 2000). Neste contexto, Pette & Staron (2001), utilizando-se da reação histoquímica para a ATPase miofibrilar, da Imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos para isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) e da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta (*slow fibers*): tipo I, expressando MHCI e fibras de contração rápida (*fast fibers*): tipo II, subdivididas em tipo IIA (MHCIIa), tipo IID (MHCIIId) e tipo IIB (MHCIIb). Os autores classificaram estas fibras como puras, uma vez que expressavam uma única isoforma de MHC. As fibras do tipo IID (MHCIIId) são equivalentes as fibras IIX (MHCIIx), descritas em ratos (Schiaffino & Reggiani, 1994).

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

A diversidade funcional e metabólica dos diferentes tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (Campos et al., 2002). Além disso, o músculo apresenta uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características estruturais, metabólicas e funcionais em consequência de estímulos que modificam o ambiente muscular (hipóxia e estresse térmico), a atividade contrátil (exercício de resistência, estimulação elétrica, desnervação e envelhecimento), a carga no músculo (exercício resistido e microgravidade) e o fornecimento de substrato (intervenção nutricional) (Pette & Staron, 2000; Fluck & Hoppeler, 2003; Magaúda et al., 2004).

No contexto da plasticidade muscular, a perda degenerativa da massa muscular (sarcopenia) é uma importante característica do envelhecimento, além de patologias como o câncer, diabetes e doenças neuromusculares. Foi demonstrado que prevenir a perda do tecido muscular aumenta o tempo de sobrevivência (Cai et al., 2004), além de diminuir a fragilidade e aumentar a independência do idoso (Baar et al., 2006). Portanto, a manutenção da massa muscular é essencial para uma melhor qualidade de vida.

O conteúdo de proteínas miofibrilares representa aproximadamente 85% do volume da fibra muscular (Hoppeler, 1986). Assim, as alterações no balanço entre a síntese e degradação de proteínas miofibrilares podem contribuir para o aumento ou redução da massa muscular. O determinante primário do tamanho muscular é a interação das vias intracelulares que afetam a taxa de síntese e degradação de proteínas musculares. Uma maior taxa de síntese do que degradação leva a uma maior massa muscular, enquanto o oposto conduz à diminuição da mesma (Matsakas et al., 2005; Baar et al., 2006; Heinemeier et al., 2007).

Nesta linha de investigação, tem sido demonstrado que o treinamento físico pode modular o grau de síntese e degradação das proteínas miofibrilares. Vários trabalhos apontam um aumento da síntese protéica, após uma única sessão de treinamento resistido, que pode

permanecer elevada por até 24 h (Rennie et al., 2004), 36 h (MacDougall et al., 1995) e 48 h (Phillips et al., 1997). Contudo, em modelos de treinamento resistido de longo prazo, que envolvem sessões repetidas de exercícios, além de um aumento da síntese miofibrilar, as células satélites podem ser ativadas para a proliferação e diferenciação, a fim de fornecer mionúcleos durante a regeneração da microlesão muscular (miotrauma adaptativo), contribuindo para a hipertrofia da miofibrila (Hawke & Garry, 2001; Chargé & Rudnicki, 2004).

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

2. Adaptações do Músculo Esquelético ao Treinamento Aeróbio

Respostas clássicas para o treinamento aeróbio incluem o aumento da potência aeróbia, do número de mitocôndrias, da atividade das enzimas do metabolismo oxidativo e da captação de oxigênio em exercício submáximo, enquanto pequenas mudanças são relatadas na massa muscular (Hawley, 2002; Trappe et al., 2006). Em adição, inúmeros estudos histoquímicos e bioquímicos demonstraram que o treinamento aeróbio pode alterar a distribuição dos tipos de fibras e conteúdo das isoformas de MHC do músculo esquelético (Fitzsimons et al., 1990; Demirel et al., 1999; Harber et al., 2002). O foco principal dessas investigações tem sido identificar a relação estímulo-resposta entre os padrões de atividade neural e as adaptações agudas e crônicas das fibras musculares. Neste contexto, a contribuição da atividade neuromuscular para a manutenção das propriedades fenotípicas das fibras musculares tem sido extensivamente investigada em experimentos de desnervação (Carraro et al., 1985; Jakubiec-Puka et al., 1990; D'Albis et al., 1994) e reinervação cruzada (Buller et al., 1960). A desnervação total conduz a conversão fenotípica total das fibras musculares, na qual o músculo rápido torna-se lento e o músculo lento torna-se rápido. Semelhantemente, a reinervação cruzada de um músculo rápido por um nervo peculiar a fibras lentas, promove a conversão do músculo para um fenótipo lento. Considerando o importante papel do padrão de

estímulo nervoso na manutenção fenotípica das fibras musculares, vários estudos procuraram transcrever o padrão tônico de estimulação neuromuscular, para investigar as alterações fenotípicas das fibras musculares em resposta ao treinamento aeróbio. Assim, a estimulação elétrica crônica de baixa frequência (Chronic low-frequency stimulation, CLFS) tem sido utilizada para imitar o padrão de impulso tônico típico das fibras de contração lenta (Salmons & Vrbová, 1969; Simoneau & Pette, 1988), possibilitando assim o estudo das adaptações fenotípicas musculares em resposta a padrões de estímulos similares ao exercício aeróbio.

As mudanças na distribuição de fibras induzidas pela CLFS seguem uma ordem contínua de transição das isoformas rápidas de MHC em direção a isoformas mais lentas, como descrito em músculos de ratos (MHCIIb→MHCIId→MHCIIa) e coelhos (MHCIId→MHCIIa→MHCI) (Pette & Staron, 2000). A transição das fibras rápidas em lentas induzida pela CLFS parece não ocorrer durante o treinamento aeróbio de baixa intensidade (Fitzsimons et al., 1990). No entanto, o aumento da intensidade e volume de treinamento pode promover esta transição (IID→IIA→I), similar ao relatado na CLFS (Simoneau & Pette, 1988). Assim, o padrão de atividade contrátil parece ser o fator primário para induzir a transição dos tipos de fibras durante o exercício aeróbio. Neste contexto, Demirel et al. (1999) observaram a relação estímulo-resposta entre o volume de treinamento aeróbio (corrida a 75% VO₂ máx, 4 a 5 dias/semana) e as mudanças fenotípicas de diferentes músculos em 3 grupos de ratos: treinado 30 min/dia (G1), treinado 60 min/dia (G2) e treinado 90 min/dia (G3). Após 10 semanas de treinamento houve um aumento da MHCI, MHCIIa e MHCIIId/x, com recíproca redução da MHCIIb no músculo extensor longo dos dedos (EDL) do grupo de maior volume (G3). Além disso, houve uma redução na MHCIIb, acompanhada de um aumento na MHCIIa no músculo plantar dos três grupos. No músculo sóleo, o treinamento com duração superior a 60 minutos provocou redução da MHCIIa e aumento da MHCI. Os resultados deste estudo demonstram que o treinamento aeróbio pode induzir a conversão das isoformas de MHC rápidas para lentas de acordo com o volume (duração) de treinamento. Além disso, a magnitude de modulação das isoformas de MHC foi específica de acordo com o músculo. Os autores sugerem que o padrão diferencial de recrutamento das fibras pode promover mudanças peculiares na distribuição das isoformas de MHC dos diferentes músculos.

Vale ressaltar que a hipótese de transição das fibras do tipo II para tipo I (IID→IIA→I) em músculo humano, após treinamento aeróbio a longo-prazo, é formulada

com base em estudos que analisaram a proporção das fibras musculares de indivíduos previamente treinados. Tal fato não exclui a possibilidade genética desses indivíduos já apresentarem maiores proporções de fibras do tipo I antes de iniciarem o período de treinamento. Estudos que investigaram a modulação das fibras musculares nos momentos pré e pós-treinamento aeróbio a médio e longo-prazo, tendem a invalidar a teoria da transição de fibras do tipo II para tipo I. Ingjer & Dahl (1978) observaram uma redução significativa da proporção das fibras do tipo IID (9,2 pré e 3,4% pós) e aumento das fibras IIA (26,4 pré e 31,5% pós), sem qualquer alteração no percentual de fibras do tipo I (57,9 pré e 56,5% pós) no músculo quadríceps de mulheres (20±3 anos) submetidas a 24 semanas de treinamento aeróbio. Andersen & Henriksson (1977) relataram um aumento da proporção de fibras do tipo IIA, sem alterações significantes na população de fibras do tipo I em músculo humano, após 8 semanas de treinamento aeróbio. Os resultados destes estudos sugerem que a transição de fibras induzidas pelo treinamento aeróbio não alcance a transição das fibras do tipo II para tipo I, mas sim, uma modulação em meio às fibras do tipo II (IID→IIA). Consistente com esta hipótese, Trappe et al. (1995) analisando 28 maratonistas altamente treinados, em 1973 e, novamente em 1992, observaram que os indivíduos que continuavam altamente treinados não apresentaram alterações significantes no percentual de fibras do tipo I, por ocasião da análise realizada após 20 anos. Uma vez que os atletas envolvidos em esportes de endurance normalmente apresentem uma maior proporção de fibras do tipo I em relação a indivíduos não-treinados (Jansson & Kaijser, 1977), parece razoável supor um engajamento voluntário desses indivíduos em programas de treinamento aeróbio, visto que a alta percentagem de fibras tipo I os tornariam mais aptos para este tipo de atividade. Esta idéia é corroborada pelo fato de que os sete indivíduos que completaram o programa de treinamento aeróbio tiveram uma maior proporção de fibras do tipo I do que os desistentes (58 e 47%, respectivamente) (Ingjer & Dahl, 1978), indicando uma aptidão genética desses indivíduos para atividade aeróbia.

Embora inúmeros trabalhos relatem uma maior proporção de fibras do tipo I em indivíduos submetidos ao treinamento aeróbio de longo-prazo, algumas questões ainda persistem quanto à contribuição da genética e do treinamento para a transição das fibras do tipo II para fibras do tipo I (IID→IIA→I). A predominância de fibras do tipo I em músculos locomotores (exemplo: gastrocnêmio e vasto lateral) de indivíduos engajados em programas de treinamento aeróbio a longo-prazo ocorre devido ao fator genético ou treinamento?

Embora algumas evidências suportem a hipótese de que o treinamento aeróbio contribua para a transição das fibras do tipo II para tipo I, a determinação genética prévia parece ser o determinante primário para a alta proporção de fibras do tipo I em atletas de endurance, de modo que esses indivíduos potencialmente apresentem maior aptidão para este tipo de atividade. Tal fato poderia explicar a seleção destes atletas para eventos de longa duração. Enquanto os resultados permanecem contraditórios, novas pesquisas são necessárias para melhor elucidar a influência da genética e do treinamento aeróbio sobre as alterações na proporção de fibras e isoformas de MHC dos diferentes músculos. Estudos recentes relatam a ativação de várias vias transcricionais (por ex: a Calcineurina, proteína fosfatase dependente de cálcio) que controlam a expressão de genes envolvidos com a manutenção para o fenótipo “*slow*” das fibras musculares em resposta ao exercício aeróbio.

3. Mecanismos Moleculares Envolvidos na Modulação das Fibras Musculares

A transição/modulação dos tipos de fibras musculares não envolve apenas mudanças na expressão das isoformas de cadeia pesada da miosina (MHC), mas inclui também alterações na expressão de várias outras proteínas musculares (Pette & Staron, 2000; Olson & Willians, 2000; Allen & Leinwand, 2002). A expressão de proteínas músculo-específicas pode ser aumentada ou diminuída pela ação de fatores transcricionais, que controlam a expressão de genes músculo-específicos e pelas vias sinalizadoras que podem ser ativadas ou reprimidas em consequência aos diferentes estímulos extrínsecos (por ex: estimulação elétrica, carga mecânica e estiramento) e/ou intrínsecos (por ex: níveis intracelulares de glicogênio, ATP, K⁺, H⁺, Ca⁺² e O₂) que podem afetar o tecido muscular. Neste sentido, a magnitude e especificidade das mudanças no perfil fenotípico das fibras musculares são dependentes de alterações na transcrição (conteúdo de mRNA) e na tradução de proteínas musculares (Saltin & Gollnick, 1983; Psilander et al., 2003).

Evidências recentes apontam as vias sinalizadoras sensíveis às oscilações na [Ca⁺²] intracelular como importantes reguladores das mudanças fenotípicas dos tipos de fibras musculares. O Ca⁺² liberado do retículo sarcoplasmático por meio da interação com os receptores diidropiridínicos (DHPR) e rianodina (RYR) pode atuar como segundo mensageiro na transdução de sinais mecânicos em sinais químicos, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que modificam a função de fatores transcricionais e, conseqüentemente,

a expressão de genes músculo-específicos (Wu et al., 2000). Dentre as vias sinalizadoras reguladas pelo Ca^{+2} destaca-se a via da Calcineurina (CaN) (Chin, 2004).

A CaN é uma proteína fosfatase serina/treonina (também conhecida como PP2B ou PP3, do inglês: *protein phosphatase 2B or 3*) responsável por vários processos biológicos, incluindo a ativação de linfócitos T, o desenvolvimento e crescimento vascular, neuronal, cardíaco e também está envolvida com as alterações no perfil fenotípico das fibras do músculo estriado esquelético (Crabtree, 2001; Bueno et al., 2002; Horsley & Pavlath, 2002). É composta por duas subunidades, uma catalítica (CaNA) com sítio de ligação para a proteína Calmodulina (CaM) e, uma regulatória (CaNB) que atua como um sensor de Ca^{+} (Klee et al., 1979; Bassel-Duby & Olson, 2006). A CaNA é composta por 2 domínios, um catalítico presente na região N-terminal (responsável pela desfosforilação de fatores transcricionais) e um regulatório presente na região C-terminal. Este domínio é composto por mais 3 domínios, um de ligação com a CaNB, um de ligação com a proteína CaM e um auto-inibitório (impede a ação do domínio catalítico) (Klee et al., 1998; Al-Shanti & Stewart, 2009) (Figura 2).

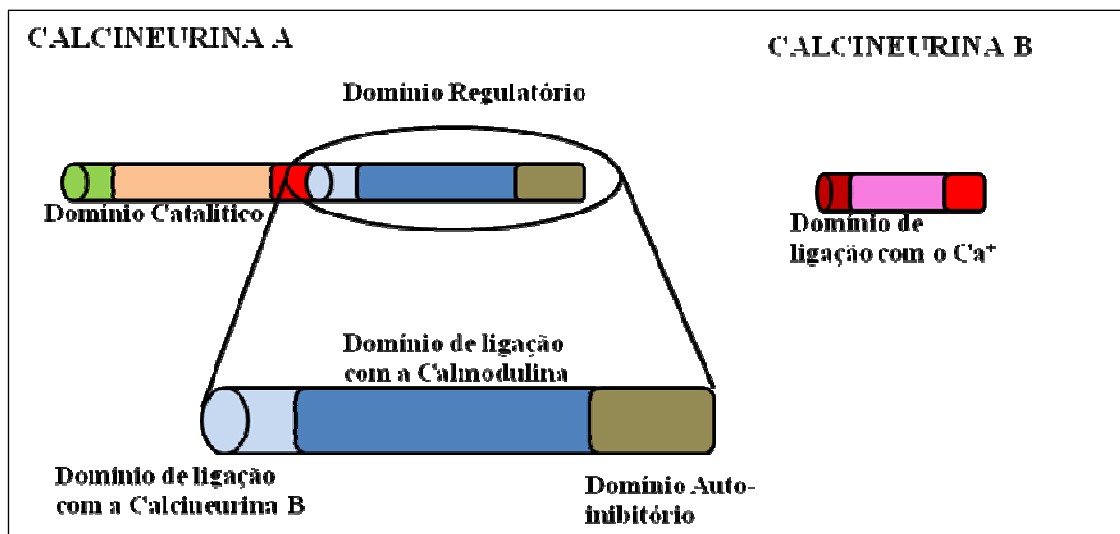


FIGURA 2. Representação esquemática da Calcineurina evidenciando a subunidade catalítica (calcineurina A) e uma subunidade regulatória (calcineurina B). A Calcineurina A apresenta dois domínios, o domínio N-terminal catalítico e o domínio C-terminal regulatório. Este domínio apresenta mais três domínios, o domínio de ligação com a calcineurina B, um de ligação com a calmodulina e outro auto-inibitório (adaptado de Al-Shanti & Stewart, 2009).

As subunidades da CaN (CaNA e CaNB) permanecem em uma conformação inativa quando há uma pequena $[Ca^{+2}]$ intracelular, no qual o domínio auto-inibitório “esconde” o domínio catalítico. No entanto, em resposta ao aumento da $[Ca^{+2}]$ intracelular, o Ca^{+2} se liga a CaNB e altera a conformação do domínio regulatório da CaNA. Esta alteração expõe o domínio de ligação com a proteína CaM permitindo a ligação entre o Ca^{+2} e a proteína CaM (Ca^{+2} -Calmodulina) e, subsequentemente, a ativação da CaN (Chin et al., 1998; Yang & Klee, 2000; Shibasaki et al., 2002). Uma vez ativada, a CaN será responsável pela retirada do fosfato de duas serinas (SRR-1 e SP) altamente conservadas na família do NFAT (*nuclear factor of activated T cells*, fator nuclear de células T ativadas), que em condições basais encontra-se no sarcoplasma (Chin et al., 1998; Tothova et al., 2006) (figura 3). O NFAT é uma família de fatores transcricionais composta por cinco isoformas (NFATc1, c2, c3, c4 e 5) que atuam em numerosos tipos celulares (Horsley & Pavlath, 2002). Após a retirada do fosfato, o NFAT é translocado para o núcleo, para a região promotora do DNA (Rao et al., 1997) e irá promover a ativação de genes músculo-específicos (Chin et al., 1998; Dupont-Versteegden et al., 2002).

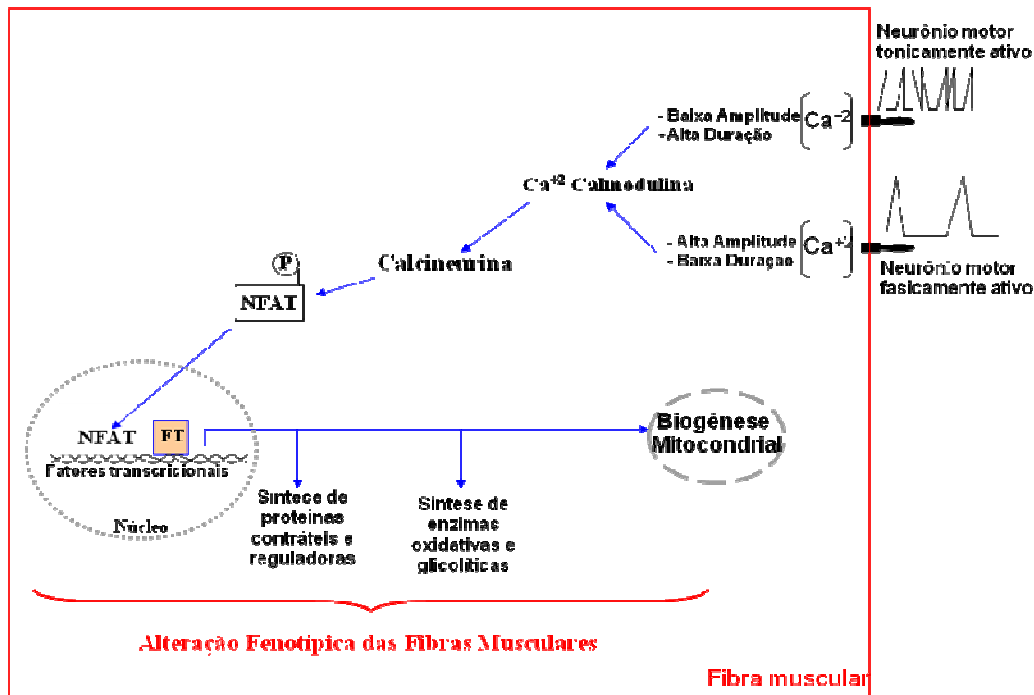


Figura 3 – Via de sinalização intracelular envolvida nas mudanças fenotípicas do músculo esquelético. Diferentes estímulos, tais como as mudanças na concentração de cálcio relacionada à contração muscular (padrão de atividade do neurônio motor), as perturbações mecânicas (estresse celular), o estiramento, a microlesão/injúria, o estado energético e a hipóxia, podem ativar a via da calcineurina que leva à expressão de fatores transcripcionais envolvidos com a expressão de proteínas contráteis, enzimas, e a biogênese mitocondrial, de acordo com a especificidade da resposta funcional (Adaptado de Tidball, 2005).

A habilidade da CaN para discriminar as flutuações na $[Ca^{+2}]$ intracelular, sugere que a mesma pode afetar a expressão de genes musculares em diferentes tipos de fibras. Em condições de repouso, a $[Ca^{+2}]$ nas fibras musculares isoladas varia entre 30-50 nM (Wu et al., 2000). Por outro lado, durante a contração, a $[Ca^{+2}]$ nas fibras de contração lenta comumente oscila entre 100-300 nM (Chin & Allen, 1996), enquanto as fibras rápidas geralmente apresentam elevações transitórias de alta amplitude, oscilando entre 1-2 μ M (Westerblad & Allen, 1991). Essa elevação transitória da $[Ca^{+2}]$ durante a atividade contrátil não permite a ativação da CaN (Dolmetsch et al., 1997), sugerindo que a sinalização molecular da CaN seja modulada pela relação entre o estímulo e a $[Ca^{+2}]$ intracelular. Nesta linha de investigação, Liu et al. (2001) demonstraram que a translocação do NFAT para o núcleo em cultura de células musculares, foi estimulada com padrões de atividade similar a

ativação de fibras lentas, enquanto que o estímulo para ativação das fibras rápidas inibiu a translocação do NFAT. Os resultados demonstram que as oscilações na $[Ca^{+2}]$ podem ser um fator determinante para a manutenção fenotípica muscular, sugerindo que o padrão tônico de estimulação, similar ao observado em fibras lentas, pode controlar seletivamente a ativação da via da CaN. Neste contexto, Chin (2005) relata que a expressão dos diferentes genes ocorre de forma diferencial entre as fibras de contração rápida (tipo IID e IIA) e lenta (tipo I), suportando a idéia de que o nível da ativação muscular, como resultado da amplitude e duração das elevações na $[Ca^{+2}]$ intracelular, pode determinar o padrão de expressão gênica nos diferentes tipos de fibras. Assim, Serrano et al. (2001) mostraram um aumento na proporção de fibras rápidas do músculo sóleo de ratos tratados com ciclosporina A (CsA), um inibidor da CaN. Os resultados mostraram o importante papel da CaN na regulação da função muscular, particularmente, na regulação do fenótipo lento da fibra muscular.

Em adição, Mitchell et al. (2002) sugeriram que as vias de sinalização no músculo esquelético mediadas pela CaN podem não ser reguladas exclusivamente pelas mudanças na $[Ca^{+2}]$ intracelular, mas também pelos mecanismos que regulam a expressão de outras subunidades da CaN (CaNA e CaNB). Os autores demonstraram que a expressão protéica da CaNB é maior em músculos lentos, comparado a músculos rápidos, enquanto a CaNA é mais expressa em músculos rápidos. Deste modo, a eficiência da CaN em um determinado músculo pode ser dependente da expressão da subunidade da CaN, sugerindo que em estudos envolvendo a contribuição da CaN nas alterações fenotípicas das fibras musculares, seja comprovado que ocorreu a inibição total da expressão da CaN no músculo investigado. Embora a imunossupressão da CaN com CsA seja uma ferramenta amplamente utilizada para investigar os efeitos da CaN no controle do fenótipo muscular, deve-se considerar que a inibição da CaN pode não apresentar uma relação direta de causa-efeito na indução da transformação dos tipos de fibras. Chin et al. (1998) relataram que o aumento da proporção de fibras rápidas no músculo sóleo de ratos que receberam CsA, pode não ter ocorrido exclusivamente devido ao efeito específico da droga sobre a CaN, mas também pelo efeito inespecífico sobre outras proteínas que não estão associadas a inibição da CaN do músculo esquelético. Tal fato sugere que outras vias podem estar envolvidas na modulação dos diferentes tipos de fibras do músculo esquelético.

4. Mecanismos Moleculares Envolvidos no Controle do Fenótipo Muscular

A magnitude e especificidade das mudanças no perfil fenotípico e na massa muscular (hipertrofia) aos diversos modelos e protocolos de exercício/treinamento físico, são dependentes de alterações na expressão gênica (conteúdo de mRNA) e na tradução de proteínas musculares (Saltin & Gollnick, 1983; Psilander et al., 2003). A expressão de genes músculo-específicos pode ser aumentada ou diminuída pela ação de fatores transcricionais e diferentes vias intracelulares, que podem ser ativadas ou reprimidas em consequência de diferentes estímulos extrínsecos (por exemplo: carga mecânica, estresse mecânico, estiramento) e intrínsecos (por exemplo: miotrauma adaptativo, níveis de cálcio intracelular, hipóxia e estado redox) que podem afetar o tecido muscular.

Dentre estas vias moleculares, destacam-se as vias do fator de crescimento semelhante à insulina, *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) e da miostatina. Estas proteínas podem atuar como reguladores positivos (IGF-I) ou negativos (miostatina) durante o processo de hipertrofia (Chargé & Rudnicki, 2004) e, assim, têm sido descritas como importantes mediadores do crescimento e da homeostase muscular (Walsh & Celeste, 2005; Heinemeier et al., 2007; Federeck & Rupert, 2008).

De fato, o IGF-I tem sido descrito como um potente sinal anabólico no tecido muscular, estimulando a síntese protéica em diferentes condições fisiológicas (Hobler et al., 1998; Barton-Davis et al., 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005). A expressão de IGF-I no músculo promove significante hipertrofia e concomitante aumento da produção de força (Barton-Davis et al., 1998). Contudo, o efeito anabólico do IGF-I pode ser potencializado pela carga mecânica, assim como observado nos modelos de treinamento resistido (Burke et al., 2008) e hipertrofia compensatória induzida pela sobrecarga gerada após a retirada de músculos sinergistas (DeVol et al., 1990). A importância do IGF-I na promoção da hipertrofia muscular foi demonstrada em estudos que monitoraram o aumento da expressão do IGF-I em associação com o aumento da massa muscular (Goldspink et al., 1995; Phelan & Gonyea 1997). O IGF-I pode atuar de modo autócrino ou parácrino, e/ou através das vias miogênicas, pela ativação das células satélites (Barton-Davis et al., 1999). Além disso, o IGF-I pode ser liberado em resposta a carga mecânica e, conseqüentemente, desencadear uma cascata de eventos intracelulares, por meio da via $IRS \rightarrow PI3K \rightarrow AKT \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6K$, que promove aumento da síntese protéica.

Em contraste ao IGF-I a miostatina (MSTN), um membro da família do TGF- β também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF8), é caracterizada como um potente regulador negativo do crescimento muscular (Patel & Amthor, 2005; Walsh & Celest, 2005; Federeck & Rupert, 2008). Além da ação inibitória sobre a ativação das células satélites, a MSTN pode inibir a atuação de fatores transcricionais, assim como a MyoD e a miogenina (Durieux et al., 2007) e promover proteólise através de regulação de alguns componentes do sistema ubiquitina-proteossoma (Gilson et al., 2007). Várias semanas de treinamento de força reduz o conteúdo de proteína e mRNA para MSTN em músculo esquelético de humanos (Roth et al., 2003) e ratos (Heinemeier et al., 2006). Reciprocamente, o bloqueio do gene da MSTN causa aumento da massa muscular tanto em humanos (Schuelke et al., 2004) quanto em animais (Patel & Amthor, 2005; Federeck & Rupert, 2008), e o treinamento de força de curto prazo reduz os níveis do gene da MSTN em conjunto com o aumento do IGF-I em músculo esquelético humano (Heinemeier et al., 2007).

No estudo de Amthor et al. (2007), o bloqueio da MSTN em camundongos promoveu aumento da massa muscular, porém a produção da força foi prejudicada e as enzimas oxidativas diminuídas. A expressão da MSTN parece ser mais evidente nos músculos de contração rápida (Carlson et al., 1999). Neste contexto, Matsakas et al. (2005), observaram uma expressão diferencial da MSTN em diferentes músculos de ratos submetidos a treinamento aeróbio de curto prazo, na qual evidenciaram uma diminuição do conteúdo de mRNA para miostatina nos músculos gastrocnêmio e vasto lateral, sem qualquer alteração no músculo sóleo.

Embora numerosos estudos relatem os efeitos antagônicos do IGF-I, CaN e da MSTN no controle da massa muscular, a maioria destes estudos utilizou-se de bloqueadores farmacológicos, nocaute gênico, modelos de atrofia e treinamento resistido para investigar a expressão desses genes no músculo esquelético. Porém, a expressão diferencial do IGF-I, CaN e da MSTN em diferentes músculos esqueléticos após treinamento aeróbio permanece não esclarecida. Em adição, algumas questões persistem em relação ao papel da CaN nas adaptações musculares ao treinamento aeróbio. A CaN é expressa de modo semelhante em músculos oxidativos e glicolíticos? Qual a contribuição e a relação da CaN e do IGF-I no controle do fenótipo muscular promovido pelo treinamento aeróbio? Desta forma, a hipótese deste trabalho é que há uma expressão diferencial do IGF-I, da CaN e da MSTN em músculos

de contração rápida (glicolíticos) e lenta (oxidativos), em resposta as adaptações morfofuncionais do músculo esquelético ao treinamento aeróbio de longo prazo.

II – JUSTIFICATIVA

Pesquisas recentes avançam no entendimento das respostas celulares e moleculares envolvidas no controle da expressão de genes relacionados ao processo de adaptação e modulação do perfil fenotípico muscular, na tentativa de responder uma questão fundamental no campo da ciência dos esportes: Como o músculo se adapta ao exercício físico?

A compreensão desta resposta é relevante para o interesse público e para futuras pesquisas na ciência do esporte, visto que, fornece evidências para um melhor direcionamento dos programas de exercício, tanto no âmbito esportivo (atletas de elite), como na promoção da saúde (manutenção da massa muscular e prevenção da sarcopenia). Além disso, abrange uma maior explicação a respeito da capacidade regenerativa do tecido muscular, em resposta ao treinamento físico.

III – OBJETIVOS

Avaliar as adaptações morfofuncionais, a expressão gênica e proteica do IGF-I, da CaN e da MSTN em músculos glicolítico (*plantar*) e oxidativo (*sóleo*) de ratos submetidos ao treinamento aeróbio a longo prazo.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados 16 ratos Wistar machos (83 dias, 340 a 400 g), provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas, SP. Os animais foram mantidos em gaiolas (4 animais por gaiola), no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde receberão ração e água *ad libitum*.

Para a realização do experimento foram utilizados 2 grupos experimentais:

- ❖ T (n=8): Animais treinados 8 semanas.
- ❖ C (n=8): Animais controles 8 semanas.

2. Protocolo de Treinamento

O grupo controle foi mantido em água rasa durante todo o período do treinamento, enquanto o grupo treinado foi submetido a um programa de treinamento aeróbio de natação durante 8 semanas (5 dias/semana), semelhante ao proposto por Gobatto et al.,(2001). O treinamento foi realizado em um aquário subdividido em compartimentos individualizados, contendo água a 28-30°C e 50 cm de profundidade. O volume (tempo) e intensidade (sobrecarga) de treinamento foram progressivos, sendo equivalente a 10 min, sem sobrecarga (1ª sem); 20 min, 1% (2ª sem); 25, 30, 35 e 40 min, 3% (do início ao final da 3ª sem); 45, 50, 55 e 60 min, 5% (do início ao final da 4ª sem) e 60 min, 5% (5ª a 8ª sem). As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h.

3. Dados Anatômicos

Durante todo o experimento foram monitorados, em dias específicos, o peso corporal e o consumo de ração dos animais. Ao final do experimento os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. A seguir, o músculo plantar (PL) e sóleo (SOL) direito foram retirados, pesados e a hipertrofia analisada através da relação peso do músculo/peso corporal (Rel M/P).

4. Análise Morfológica

Após a retirada do músculo, uma porção foi separada e imediatamente congelada em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido a -156°C. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise. Cortes histológicos (12 µm) foram obtidos em um criostato a -20°C, com algumas lâminas sendo submetidas à coloração HE para a análise da morfologia geral das fibras musculares e outras utilizadas para a análise dos tipos e subtipos de fibras, através reação histoquímica da mATPase (miofibrillar adenosine triphosphatase), após pré incubação em pH 4.1, 4.52 e 10.6 para o músculo PL e 4.2, 4.32 e 9.8 para o músculo SOL (Staron et al., 1999).

Utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens (Leika Qwin) foi determinada a frequência dos tipos e subtipos de fibras e mensurada a área de secção transversal de aproximadamente 200 fibras (quatro campos aleatórios de cada músculo) de cada animal, com pelo menos 50 fibras de cada tipo.

5. Eletroforese das miosinas

A análise bioquímica da cadeia pesada da miosina (MHC) foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram coletados 12 cortes de 12 μm de espessura de cada amostra que foi congelada para a análise morfológica. Estes foram colocados em 0,5 ml de uma solução contendo glicerol 10% (w/vol), 2-mercaptoethanol 5 % (vol/vol) e sodium dodecylsulfate (SDS) 2,3 % (w/vol) em Tris/HCl buffer 0.9% (pH 6,8) (w/vol). Os cortes foram agitados durante um minuto e aquecidos por 10 minutos a 60 °C. Foi realizada a eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (5-8 μl), em gel (gradiente de 7-10%) de poliacrilamida (SDS), com um gel de empacotamento a 4%, em um período de 19-21 horas de corrida a 120 V e, em seguida, corados com Coomassie Blue (Bar & Pette, 1988).

Os géis foram utilizados para determinar a presença das isoformas de MHC identificadas de acordo com seus respectivos pesos moleculares, evidenciando as bandas nas regiões correspondentes. Foi incluída também uma amostra do músculo extensor longo dos dedos (EDL) como controle para comparação, por apresentar cerca de 90% de MHCII e 10% de MHCI.

6. Análise Densitométrica

Os géis contendo as bandas de miosina foram escaneados e as imagens capturadas pelo programa VDS (Pharmacia Biotech). Em seguida, estas imagens foram transferidas para o programa Image Master VDS (versão 3.0) e obtida à percentagem relativa (IOD) das isoformas MHCI e MHCII.

7. Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

a) Extração de RNA com TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada a extração do RNA total dos fragmentos musculares congelados, sendo individualmente homogeneizados com o homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol para 50-100 mg de tecido. Cada homogeneizado foi incubado durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos.

Foram acrescentados 200µl de clorofórmio em cada amostra, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando por três minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O RNA permaneceu na fase aquosa.

A fase aquosa formada após a centrifugação do material foi transferida para um segundo tubo autoclavado. O RNA foi precipitado por intermédio da incubação com 500 µl de álcool isopropílico, por mL de TRIzol utilizado inicialmente, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA, invisível antes dessa centrifugação, formou um pellet no fundo de tubo.

O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet formado foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. Em seguida, esse sedimento de RNA formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) a 4°C e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase e, finalmente, armazenado em freezer à - 80°C.

Para quantificação do RNA total foi utilizado o espectrofotômetro *NanoDrop* e com base na densidade óptica (OD) com a leitura em absorbância à 260 nm (específica para ácidos nucleicos), foi verificada a quantidade do RNA. Além disso, as razões das absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm, forneceu uma estimativa da qualidade da extração. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese capilar utilizando o Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) que calcula o número de integridade de RNA (RIN), a média dos valores de todas as amostras foi 8.7 ± 0.3 (escale 1–10), indicando um RNA de alta qualidade e com mínimo de degradação.

b) Tratamento do RNA com DNase

O RNA total obtido foi tratado com a enzima DNase para remoção de possível DNA genômico contaminante, conforme as instruções do protocolo “Deoxyribonuclease I - Amplification Grade” (*Life Technologies*). O volume de solução de RNA total equivalente a 2 µg de RNA foi transferido para um microtubo estéril, onde foram acrescentados 2 µL de

Tampão para a Reação da DNase I (10X), 2 µL de DNase I (1 unidade/µL) e Água Ultrapura livre de RNases e DNases (Gibco) na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 2µL de EDTA (25 mM, pH 8,0) a cada amostra, com posterior incubação a 65°C por 10 minutos.

c) Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a reação de Transcrição Reversa (RT) do RNA total foi utilizado o “High Capacity cDNA Archive Kit” (*Life Technologies*). A cada reação de RNA total tratado foram adicionados 10 µl de Tampão para Transcrição Reversa (10X), 4 µL de dNTPs (25X), 10 µL de Random Primers (10X), 2.5 µL da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50 unidades/µl), 2.5 µL de Inibidor de Ribonuclease Recombinante RNaseOUT (40 unidades/µL) (Invitrogen), sendo o volume final da reação ajustado para 100 µL, utilizando-se H₂O ultrapura livre de RNases e DNases (Gibco). Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos e em seguida, por 42 °C por duas horas e, em seguida, estocadas em freezer a -20°C.

d) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real após transcrição reversa (RT-qPCR)

A análise da expressão dos genes IGF-1, MSTN e CaN foi realizada pela RT-qPCR. Para cada gene, foi desenhado um conjunto de primers senso e antisenso, com base na respectiva sequência parcial codificante expressa na musculatura do rato, utilizando-se o software Primer Express® (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*) (Tabela 1). Os primers foram sintetizados comercialmente (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*) e diluídos em água livre de DNase e RNase (*Gibco – Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*) para uma concentração final de 5 µM.

Tabela 1. Primers utilizados na RT-qPCR quantitativa em tempo real para a amplificação dos genes IGF-1, MSTN e CaN.

Genes	Número de Acesso	Sequência (5' – 3')
IGF-I	NM178866	F: GCTATGGCTCCAGCATDCG R: TCCGGAAGCAACACTCATCC
CaN A	D90035.1	F: AGGCGATTGATCCCAAGTTG R: GGAAATGGAACGGCTTTCAC
CaN B	D14568.1	F: AGATGGGAAATGAGGCGAGTT R: TCTCATCAGCATCGAAGTGTGA
MSTN	NM019151	F: GGTCCCGGAGAGACTTTGGG R: CGACAGCACCGCGATTC
TBP	NM_001004198	F: TCCCTCCTCTGCACTGAGATC R: GCAGCACAGAGCAAGCAACT
ACTB	NM_031144	F: TCAGGTCATCACTATCGGCAATG R: TTTCATGGATGCCACAGGATTC
GAPDH	AB017801.1	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTC

F: primer forward; R: primer reverse

Em estudos prévios realizados no nosso laboratório foi testada a eficiência dos primers senso e antisenso específicos para a amplificação dos genes alvo (IGF-I e MSTN) e de referência (ACTB, Ciclofilina A, GAPDH, HPRT e TBP) em amostras de cDNA obtidas do músculo esquelético de ratos. Nesse estudo, foi testada a eficiência dos conjuntos de primers senso e antisenso para os genes CaN A e CaN B construindo-se curvas-padrão a partir de um produto de PCR amplificado de um *pool* de cDNA de todas as amostras e diluído 1000X em água ultrapura. Esse produto de PCR diluído correspondeu à primeira diluição da curva-padrão, sendo utilizadas mais seis diluições seriadas, a partir desse produto, na ordem de diluição de 10X. Para cada diluição da curva, a reação de amplificação foi constituída por 2 µL da amostra contendo o produto de PCR na diluição desejada, 12.5 µL de *Power SYBR Green Master Mix 2.5X* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e 2 µL de cada primer (400 nM), em um volume final de 25 µL. Para cada gene, foram incluídos um controle negativo da PCR (amostra de cDNA substituída por água livre de RNase) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas no “Sistema *Real Time* PCR 7300” (Life Technologies Corporation, Carlsbad,

CA, USA), utilizando-se as condições de termociclagem universal (configuradas no software): 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a corrida, foi analisada a curva de dissociação para confirmar a amplificação específica dos produtos de RT-qPCR de cada gene. A curva de dissociação permite identificar o produto específico, pela presença de um único pico, e fazer a distinção entre o DNA alvo (amplicon) e a formação de dímeros de primers. Um único pico na curva de dissociação indica que todos os amplicons presentes na reação apresentam o mesmo tamanho e, portanto, denaturam a uma mesma temperatura, de acordo com a queda brusca de fluorescência do SYBR Green observada nessa curva (Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2004).

Para todos os genes-alvo e genes de referência foram construídas placas de reação contendo 2 µL de cDNA do respectivo animal, 12.5 µL de *Power SYBR Green Master Mix 2.5X* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e 2 µL de cada primer (400 nM), completando com água livre de RNase para um volume final de 25 µL. Os parâmetros da reação foram os mesmos descritos anteriormente na reação para teste de eficiência dos primers. Foram determinados, manualmente, os parâmetros *baseline* e *threshold* para a obtenção dos valores de Ct (ciclo *threshold*: ciclo da PCR no qual a fluorescência gerada na reação cruza o limiar *threshold*) que foram utilizados para obtenção do resultado final de expressão gênica em cada amostra.

A normalização é um componente essencial para um ensaio confiável de RT-qPCR, pois este processo controla as variações da extração, transcrição reversa e eficiência da amplificação, possibilitando, assim, as comparações das concentrações de RNAm em diferentes amostras. A utilização de genes de referência como um controle interno é o método mais comum para normalização dos dados de RNAm. A normalização através de apenas um gene de referência não é aceita a menos que os investigadores apresentem claras evidências de que sua expressão não varie sobre as condições experimentais. O número ideal e escolha dos genes de referência devem ser determinados experimentalmente e o método relado (Bustin, 2009). Nenhum gene é expresso constitutivamente em todos os tipos celulares e sobre todas as condições experimentais, implicando que a estabilidade da expressão dos genes de referência pretendida deve ser verificada antes de cada experimento (Andersen et al., 2004). Nesse estudo, a estabilidade dos genes de referência ACTB, Ciclofilina A, GAPDH, HPRT e TBP foi testada utilizando-se o software *geNorm* (Vandesompele et al., 2002). Esse software,

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

8. Análise da expressão protéica

A avaliação da expressão protéica de IGF-1, MSTN e CaN nos músculos glicolítico (*plantar*) e oxidativo (*sóleo*) de ratos submetidos ao treinamento aeróbio de longo prazo foi feita utilizando-se a técnica do *Western Blot*.

a) Extração, Quantificação e Eletroforese de Proteínas

As amostras musculares congeladas foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) com 0,5 mL de tampão de lise (1% Triton X-100, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, aprotinina 10 µg/mL, PMSF 1 mM, ortovanadato de sódio - Na₃VO₄ 0.25 mM, NaCl 150 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7.5). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 50 µL do homogenato foi tratada com 25 µL do tampão de amostra de Laemmli (SDS 2%, glycerol 20%, azul de bromofenol 0.04 mg/mL, Tris-HCl 0.12M pH 6.8 e β-mercaptoetanol 0.28M). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 minutos e armazenadas em freezer -20°C até sua utilização.

Uma alíquota do extrato puro de cada amostra (não tratado com Laemmli) foi usada para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Quantidades exatas de proteínas totais de cada amostra (70 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corados com Coomassie blue, para confirmar o padrão eletroforético similar das proteínas de cada animal.

b) Padronização do Western Blot

Confirmado o padrão eletroforético similar entre os grupos, as amostras foram novamente separadas por SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), em sistema úmido.

Utilizando-se o *SNAP i.d.*[®] *Protein Detection System* (Millipore Company, Billerica, MA, USA) as membranas foram tratadas com solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) 3% diluída em tampão fosfato salino (PBS-T: NaH₂PO₄.H₂O 0,1 M, Na₂HPO₄.7H₂O 0,1 M, NaCl 0,15M, Tween-20 0,1% pH 7,4), por 10 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (Tabela 2) diluídos em solução BSA 1%, por 10 minutos, nas concentrações previamente testadas. Após 4 etapas de lavagem com tampão PBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários, conjugados com a enzima *horseradich peroxidase* (HRP), por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas e foi utilizado o sistema de detecção quimioluminescente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar um sinal na posição referente a cada proteína detectada.

Tabela 2: Relação dos anticorpos primários e secundários utilizados no *Western Blot*.

Proteína	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Fabricante
IGF-I	C-20 (sc-7144)	donkey anti-goat IgG-HRP/ sc-2020	Santa Cruz Biotechnology California, USA
Miostatina	C-20 (sc-6884)	donkey anti-goat IgG-HRP/ sc-2020	
Calcineurina A	ab3673	Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - Fc (HRP) (ab97200)	ABCAM
Calcineurina B	CN-b1 (ab49658)	Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgM - mu chain (HRP) (ab97230)	
β -actina	R-22 (sc-130657)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	Santa Cruz Biotechnology California, USA

c) Análise Densitométrica e Normalização dos Resultados

O sinal gerado pelas bandas foi captado em filme fotográfico e a quantificação foi feita por densitometria, utilizando-se o software *Image J software for Windows* (versão 1.71, 2006, Áustria). Os valores de expressão protéica de IGF-1, MSTN e CaN foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína β -actina, usada como referência. Os valores de expressão relativa gerados são apresentados como unidades arbitrárias.

9. Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado um software (SPSS para Windows, versão 13.0). Para garantir a estabilidade dos dados, o procedimento estatístico foi realizado após o estudo preliminar da variável relacionada à normalidade e igualdade de variância entre todos os grupos, com poder estatístico de 80% para as comparações realizadas. Dados de frequência dos tipos de fibras foram analisadas pelo Teste de Goodman para contrastes de populações intermultinomial e intramultinomial (Goodman, 1964; Goodmand, 1965) para avaliar as diferenças entre os grupos. Comparações estatísticas entre os grupos foi feita pelo teste t de Student para peso corporal, ingestão alimentar, massa muscular, expressão gênica e proteica. Para os valores das isoformas de MHC foi feito o teste de Mann-Whitney (Zar, 1999). Os dados são expressos como média \pm SD. As diferenças foram consideradas significativas com valor de $p = <0,05$.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen DL and Leinwand LA.** 2002. Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIA myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 277: 45323–30.
- Al-Shanti N and Stewart CE.** 2009. Ca²⁺/calmodulin-dependent transcriptional pathways: potential mediators of skeletal muscle growth and development. *Biol. Rev.* 84: 637–652.
- Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbova G, Partridge T, Zammit P, Bungler L and Patel K.** 2007. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1835–1840.
- Andersen P & Henriksson J.** 1977. Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 99(1): 123-125.
- Andersen CL, Jensen JL and Ørntoft TF.** 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* 64, 5245–5250
- Baar K, Nader N and Bodine S.** 2006. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Biochem J* 42:61-74.
- Bar A and Pette D.** 1988. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235:153.
- Bárány M.** 1967. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: 197-218.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N and Sweeney HL.** 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15603-15607.
- Barton-Davis ER, Shoturna DI and Sweeney HL.** 1999. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167(4):301-305.
- Bassel-Duby R and Olson EN.** 2006. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75:19–37.

- Bickel CS, Slade J, Mahoney ED, Haddad D, Dudley A and Adams GR.** 2005. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol* 98:482–488.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:48-254.
- Bueno OF, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA and De Windt LJ.** 2002. Calcium and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc. Res.* 53: 806–821.
- Buller AJ, Eccles JC and Eccles RM.** 1960. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J Physiol* 150: 417-439.
- Burke DG, Candow DG, Chilibeck PD, MacNeil LG, Roy BD, Tarnopolsky MA and Ziegenfuss T.** 2008. Effect of creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18(4):389-98.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT.** 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55:4.
- Cai D, Frantz JD, Tawa Jr NE, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera, WR, Lee J, Glass DJ and Shoelson SE.** 2004. IKK_α/NF-κ_B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285–298.
- Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray T, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, and Staron RS.** 2002. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88: 50-60.
- Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE.** 1999. Skeletal muscle Myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol* 277:R601–R6.
- Carraro U, Morale D, Mussini I, Lucke S, Cantini M, Betto R, Catani C, Dalla Libera L, Betto DD and Noventa D.** 1985. Chronic denervation of rat hemidiaphragm: maintenance of fiber heterogeneity with associated increasing uniformity of myosin isoforms. *J Cell Biol* 100(1): 161-174.
- Chargé SBP and Rudnick MA.** 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238.

- Chin ER and Allen DG.** 1996. Changes in intracellular free Ca²⁺ concentration during constant 10 Hz stimulation of mouse single skeletal muscles fibers. *Physiol* 39: A-75.
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R and Williams RS.** 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12: 2499-509.
- Chin ER.** 2004. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63: 279-286.
- Chin ER.** 2005. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol* 99: 414–23.
- Crabtree GR.** 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 276: 2313–2316.
- D’Albis A, Goubel F, Couteaux R, Janmot C and Mira JC.** 1994. The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal differentiation. Denervation induces differentiation into slow-type muscles. *Eur J Biochem* 223(1): 249-258.
- Dal Pai-Silva M, Dal Pai V e Carvalho RF.** 2005. Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole, São Paulo: p83-94.
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, and Coombes JS.** 1999. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86: 1002-1008.
- DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J and Bechtel PJ.** 1990. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol* 259, E89–E95.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI.** 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858.
- Dupont-Versteegden EE, Knox M, Gurley CM, Houle JD and Peterson CA.** 2002. Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin–NFAT pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: 1387-1395.

- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A and Freyssenet D. 2007.** Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148:3140–3147.
- Elliott A and Offer G. 1978.** Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol* 123: 505-519.
- Federeck MN and Rupert JL. 2008.** Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *J Med Sci Sports* 18:123–131.
- Fitzsimons DP, Diffie GM, Herrick RE and Baldwin KM. 1990.** Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. *J Appl Physiol* 68(5): 1950-1955.
- Fluck M and Hoppeler H. 2003.** Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 160-161.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM and Thissen JP. 2007.** Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 148:452–460
- Glass DL. 2003.** Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trend Mol med* 9(8):344-350.
- Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA and Kokubun E. 2001.** Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130(1):21-7
- Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ and Lee DM. 1995.** Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am J Physiol* 268:E288-E297.
- Goldspink G. 2005.** Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiol* 20:232-238.
- Goodman LA. 1964.** Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat* 35: 716-725.
- Goodman LA. 1965.** On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7: 247–254.
- Harber MP, Gallagher PM, Trautmann J and Trappe SW. 2002.** Myosin heavy chain composition of single muscle fibers in male distance runners. *Int J Sports Med* 23(7): 484-488.

- Hawke TJ and Garry DJ.** 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 9(2):534-551.
- Hawley JA.** 2002. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(3): 218-222.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM and Kjaer M.** 2006. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and -tendon: Differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102:573–581.
- Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM and Kjaer M.** 2007. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol* 102: 573–581.
- Hobler SC, Williams AB, Fischer JE and Hasselgren PO.** 1998. IGF-I stimulates protein synthesis but does not inhibit protein breakdown in muscle from septic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274:571-576.
- Hoppeler H.** 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7:187–204
- Horsley V and Pavlath GK.** 2002. NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* 156: 771–774.
- Huxley HE.** 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356-1365.
- Ingjer F and Dahl HA.** 1978. Drop-outs during an endurance training programme. Some histochemical and physiological aspects. *Scand J Sports Sci* (in the Press).
- Jakubiec-Puka A, Kordowska J, Catani C and Carraro U.** 1990. Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. *Eur J Biochem* 193(3): 623-628.
- Jansson E and Kaijser L.** 1977. Muscle adaptation to extreme training in man *Acta Physiol Scand* 100(3): 315-324.
- Klee CB, Crouch TH and Krinks MH.** 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6270–3.
- Klee CB, Ren H and Wang X.** 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273: 13367–70.

- Liu Y, Cseresnyes Z, Randall WR and Schneider MF.** 2001. Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 155: 27–39.
- Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, and Baker H.** 1969. Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42: 1-29.
- Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F and Anastasi G.** 2004. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14: 17-21.
- Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T and Diel P.** 2005. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. *Acta Physiol Scand* 2005, 183, 299–307
- Mccall GE, Byrnes WC, Dickinson A, Pattany PM and Fleck SJ.** 1996. Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *J App Physiol* 81(5): 2004–2012.
- Mitchell PO, Mills ST, and Pavlath GK.** 2002. Calcineurin differently regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C984-C992.
- Olson EN and Williams RS.** 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 22: 510-519.
- Patel K and Amthor H.** 2005. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade - new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 15:117–126
- Pette D and Staron RS.** 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.
- Pette D and Staron RS.** 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115: 359-372.
- Phelan JN and Gonyea WJ.** 1997. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247:179-188.
- Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE and Wolfe RR.** 1997. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 273: E99–E107.
- Psilander N, Damsgaard R and Pilegaard H.** 2003. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 95:1038–1044.

- Rao A, Luo C and Hogan PG.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* 15:707–47.
- Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE and Booth FW.** 2004. Control of the size of the human muscle mass. *Annu Rev Physiol* 66: 799-828.
- Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF and Rogers MA.** 2003. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med* 228:706–709
- Salmons S and Vrbová G.** 1969. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J Physiol* 201(3): 535-549.
- Saltin B and Gollnick PD.** 1983. Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. In *Handbook of physiology: Skeletal muscle*. Bethesda MD: AM Physiol Soc 10(19):555– 632.
- Schiaffino S and Reggiani C.** 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77: 493-501.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF and Lee SJ.** 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682–2688.
- Serrano AL, Murgia M, Pallafacchina G, Calabria E, Coniglio P, Lomo T and Schiaffino S.** 2001. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13108–13113.
- Shibasaki F, Hallin U and Uchino H.** 2002. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131: 1–15.
- Simoneau JA and Pette D.** 1988. Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Pflugers Archiv: Eur J Physiol* 412: 86–92.
- Talmadge RJ and Roy RR.** 1993. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75: 2337-2340.
- Tidball JG.** 2005. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 98(5):1900-8.
- Tothova J, Blaauw B, Pallafacchina G, Rudolf R, Argentini C, Reggiani C and Schiaffino S.** 2006. NFATc1 nucleocytoplasmic shuttling is controlled by nerve activity in skeletal muscle. *J Cell Sci* 119: 1604–1611.

- Trappe SW, Costill DL, Fink WJ and Pearson DR.** 1995. Skeletal muscle characteristics among distance runners: a 20-years follow-up study. *J Appl Physiol* 78(3): 823-829.
- Trappe S, Harber M, Creer A, Gallagher P, Slivka D, Minchev K and Whitsett D.** 2006. Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101(3): 721-727.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):research0034.
- Walsh FS and Celeste AJ.** 2005. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6):1513-7.
- Weeds AG and Lowey S.** 1971. Substructure of the myosin molecule II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 61: 701-725.
- Westerblad H and Allen DG.** 1991. Changes in myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol* 98: 615-635.
- Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, Simard AR, Michel RN, Bassel-Duby R, Olson EN and Williams RS.** 2000. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 19: 1-11.
- Yang SA and Klee CB.** 2000. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochem* 39: 16147-54.
- Zar JH.** 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.

VI – CAPÍTULO

Effects of long-term aerobic training on morphology and myogenic growth factors expression in phenotypically distinct muscles

Ivan José Vechetti Júnior¹, Andreo Fernando Aguiar¹, Rodrigo Wagner Alves de Souza¹, Fernanda Losi Alves de Almeida^{1,2}, Henrique Borgatto de Almeida Dias¹, Raquel Santilone Bertaglia¹, Marco Aurélio de Aguiar e Silva¹, Fernanda Regina Carani^{1,2}, Warlen Pereira Piedade¹, Carlos Roberto Padovani³, Robson Francisco de Carvalho¹ and Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹São Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil

² University of Campinas, Institute of Biology, Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Campinas, São Paulo, Brazil

³São Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Bioestatistic, Botucatu, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

The skeletal muscle is constituted by fiber types which differ according to their contractile and metabolic properties. Muscle fibers have a high plasticity and are dynamic structures liable to modify their phenotype in response to several stimuli, such as physical training. It has been shown that aerobic training frequently leads to minor changes in muscle mass, promoting changes in muscle profile toward a more efficient pattern. Several studies have been performed to try to identify the molecular pathways involved in the muscle adaptation. Most of them converge to understand the factors that control the muscle phenotype changes including the insulin-like growth factor-I (IGF-I), Myostatin (MSTN) and Calcineurin (CaN). The purpose of this study was to test the hypothesis that muscle phenotypically distinct changes that occur during long-term aerobic training are regulated by myogenic growth factors including IGF-I, MSTN and CaN A and B. Male *Wistar* rats (80 days old, 250-300 g) were divided into two groups: trained (T; n=8) and control (C; n=8). T group underwent a swimming aerobic training program for 8 weeks (5 days/week). Training

volume and intensity were progressive: 10 min without overloading (1st week), 20 min, 1% overload (2nd week), 25, 30, 35, and 40 min, 3% overload (3rd week), 45, 50, 55, and 60 min, 5% overload (4th week and 60 min, 5% overload (5th to 8th weeks). At the end of the experiment animals were weighed and sacrificed. Soleus (SOL) and Plantaris (PL) muscles were removed and processed for histochemical, morphometrical, biochemical and molecular analyses. No significant difference was observed in the initial body weight among the groups ($p > 0.05$). After aerobic training, a reduction of the final body weight was observed in the trained ($p < 0.05$) compared with the control groups. There was no significant difference ($p > 0.05$) in muscle fiber cross sectional area (CSA) in both muscles comparing T with C groups. In PL muscle, there was a significant ($p < 0.05$) increase in the type IIA and reduction of type IIB fibers frequencies in T compared to C groups. In SOL muscle, the aerobic training promoted significant reduction ($p < 0.05$) in type I fibers with an increase in type IIA fibers frequencies in T compared to C groups. Long-term aerobic training did not induce significant changes ($p > 0.05$) in CaN A, CaN B, MSTN and IGF-1 expression in SOL and PL muscles between the groups. Comparing the CaN A protein expression between SOL and PL muscles, in SOL, the expression was higher. Based on the results of the current study, we conclude that CaN A differentially regulates slow and fast muscle phenotype. Moreover, the training program adopted did not induce muscle hypertrophy and did not alter CaN, IGF-I and MSTN expression. These myogenic growth factors are closely related to the control of the muscle mass, more than with muscle phenotype in response to long-term aerobic training.

Key Words: Skeletal muscle; Fibers types; Aerobic training; IGF-I, Calcineurin; Myostatin.

INTRODUCTION

The skeletal muscle has a high plasticity, which enables this tissue to modify its morphological, biochemical, and contractile properties and their assembly in various proportions. Four major fiber types have been characterized according to their contractile and metabolic properties: slow oxidative (type I), fast oxidative/glycolytic (type IIA), and fast/glycolytic (type IIX/D and IIB) fibers (Pette & Staron, 2000; Pette & Staron, 2001). These are dynamic structures that are liable to modify their phenotype in response to several physiological stimuli, such as physical training (Pette & Staron, 2000; Campos et al., 2002; Fluck & Hoppeler, 2003; Magaúda et al., 2004).

Studies have shown that resistance and aerobic training can promote changes in muscle fiber type frequency with an increase in IIA and a corresponding decrease in IID/X or IIB; or a decrease in I and a corresponding increase in IIA muscle fiber (Scott et al., 2001; Aguiar et al., 2010). Also, it has been largely shown that aerobic training frequently leads to minor alterations in muscle mass, promoting changes in muscle profile toward a more efficient pattern; occurs an increasing expression of enzymes involved in oxidative metabolism leading to an enhanced capacity to maintain muscle homeostasis during exercise (Booth et al., 1998), through inducing a fiber-type transition from a faster to a slower phenotype (Trappe et al., 2006).

Numerous studies have been performed to try to identify the molecular pathways involved in the muscle growth and adaptation. Most of them converge to understand the factors that control the muscle phenotype changes including the insulin-like growth factor-I (IGF-I), Myostatin (MSTN) and Calcineurin (CaN). Myostatin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) are regarded as two of the major players in regulation of muscle homeostasis (Goldspink, 2005; Matsakas & Diel, 2005). CaN is a heterodimeric serine/threonine phosphatase comprised of a calmodulin-binding catalytic A subunit and a Ca²⁺-binding regulatory B subunit (Klee et al., 1979).

The IGF-1 has several important physiological functions, particularly during growth and development. It has also received attention in recent years in studies examining exercise-induced muscle hypertrophy. IGF-1 increases muscular protein synthesis and stimulates satellite cell proliferation and differentiation in vitro (Dalla Libera et al. 2004), and also have been described as an important anabolic signal that stimulate muscle protein synthesis in several physiological conditions (Barton-Davis et al. 1999; Glass, 2003; Goldspink, 2005).

Strong evidences suggest that locally produced IGF-1, rather than circulating IGF-1 plays an important role in muscle mass maintenance, repair and hypertrophy (Favier et al., 2008). Aerobic training, apart from the well described effects on the oxidative metabolic machinery, can also elicit muscle hypertrophy (Gulve et al. 1993), and IGF-I could mediate this process (Adams, 1998).

The MSTN is a member of the TGF- β superfamily of growth factors that play critical roles in tissue growth and differentiation, regeneration and repair, and embryonic development. In skeletal muscle, MSTN has been characterized as an important and potent negative regulator of skeletal muscle growth (Hill et al., 2003; Ma et al., 2003) and is also involved with the maintenance of the adult muscle homeostasis (Tobin & Celeste, 2005; Joulia-Ekaza & Cabello, 2006).

Recent studies indicated that MSTN might also have a function in the training-induced skeletal muscle adaptation (Carlson et al., 1999; Wehling et al., 2000; Hill et al., 2003; Ma et al., 2003). The function of MSTN during the skeletal muscle adaptation has been investigated so far only with regard to resistance training (Ivey et al., 2000; Schulte & Yarasheski 2001; Peters et al., 2003; Roth et al., 2003; Walker et al., 2004; Willoughby, 2004). However, Matsakas et al. (2005), showed that short-term aerobic training in rats decrease the MSTN mRNA expression in gastrocnemius muscle, faintly decreased in vastus lateralis, and did not affect the MSTN mRNA expression in the soleus muscle; this fact indicated that MSTN is modulated with differential responses among various muscles. The study showed that short-term aerobic training may modulate MSTN mRNA levels, implying a probable role of MSTN in skeletal muscle remodeling in response to training.

CaN has emerged as a potential key signaling activated in response to sustained increases in intracellular Ca^{++} (Dolmetsch et al., 1997). Once CaN is activated, acts on the transcription factor NFAT (Nuclear Factor of activated T Cells) proteins, which translocation to the nucleus and binds to specific nucleotide recognition sequences and stimulates the transcription of target genes in cooperation with cell-specific transcription factors (Rao et al., 1997; Chin et al., 1998;). In skeletal muscle, CaN pathway is involved with the maintenance of the adult slow muscle phenotype (Chin et al., 1998; Olson & Williams, 2000; Bigard et al., 2000). The downstream cellular and molecular target by which CaN exerts its effects on aerobic training are not well characterized. Aerobic training can induce change in CaN

expression but the results are dependent on the exercise program used and the muscle morphophysiological characteristics (Mitchell et al., 2002; Grondard et al., 2008).

For this reason, the purpose of this study was to test the hypothesis that muscle phenotypically distinct changes that occur during long-term aerobic training are regulated by myogenic growth factors that control the muscle phenotype including insulin-like growth factor-I (IGF-I), Myostatin (MSTN) and Calcineurin (CaN).

METHODS

Animals and experimental groups. Sixteen male *Wistar* rats (80 days old, 250-300 g) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil). They were housed in collective polypropylene cages (4 animals per cage) covered with metallic grids, in a temperature-controlled room (22-24°C) under a 12-hour light–dark cycle, and provided with unlimited access to standard rat chow and water. These animals were randomly divided into two groups: control (C, $n = 8$) and trained (T, $n = 8$). Trained group animals were submitted to a progressive aerobic training program for 8 weeks (5 days/week). The experiment was approved by the Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol No. 107-CEEA) and was conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Training protocol. All rats of T group performed progressive aerobic training program in an aquarium of 100 x 50 X 50 cm, subdivided into four compartments, filled with 38cm of the water at 30 ± 2 °C (Fig. 1). The animals swam using washers as overload by a rubber band on their tails. Training volume and intensity were progressive: 10 min without overloading (1st week), 20 min, 1% overload (2nd week), 25, 30, 35, and 40 min, 3% overload (3rd week), 45, 50, 55, and 60 min, 5% overload (4th week) and 60 min, 5% overload (5th to 8th weeks) (Gobatto et al., 2001). Second these authors, 5% overload represent the maximal lactate steady state in rats. The overload of training was calculated based on body weight of animals, and to ensure the same training intensity throughout the experiment period, the animals were weight daily. The C group was kept in shallow water throughout the training period to reducing the effect of stress of the animals. Before the initial training program, all the animals were adapted to the water. The adaptation consisted of keeping the animals in

shallow water at 30 ± 2 °C for 5 days/week. All training sessions were performed between 2 and 4 pm in a dark room.

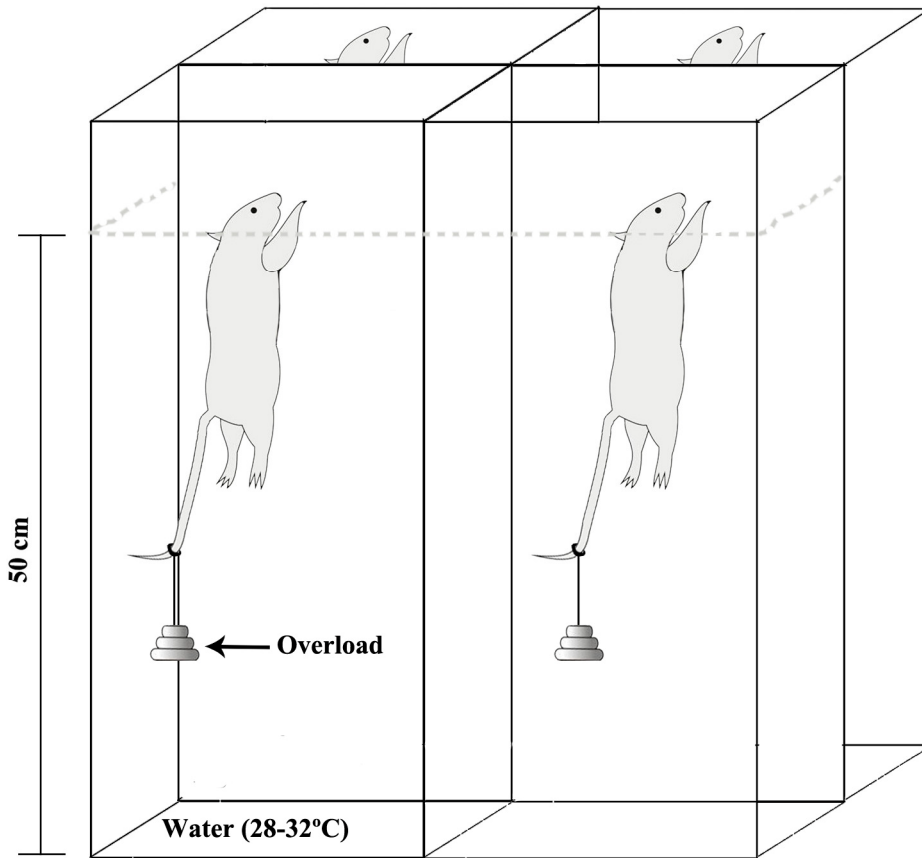


Fig. 1. Sketch of the aerobic training.

Anatomical data. Throughout the experiment the body weight and food intake were monitored daily. At the end of the training period the animals were sacrificed by decapitation. The soleus (SOL) and plantaris (PL) muscles of right and left legs were dissected out and weighted. Muscles weight was normalized to body weight (muscle weight/body weight ratio). The middle portion of right muscles were collected and frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen (-156 °C) for morphometrical, histochemical and biochemical analysis. The left muscle was directly frozen in liquid nitrogen at -156 °C for molecular analysis. Samples were kept at -80 °C until processing.

Morphometrical analysis. SOL and PL histological sections ($12\mu\text{m}$ thick) were obtained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica, Germany) at -24 °C and stained with

hematoxylin and eosin (HE). The stained sections were used for photographic documentation of three random histological fields (20 μ m lens) of each animal. Fiber cross-sectional area (CSA) was determined by measuring ~ 400 muscle fibers from each animal (Fig. 2). The CSA measure was performed using an Image Analysis System Software Leica QWin Plus, Germany).

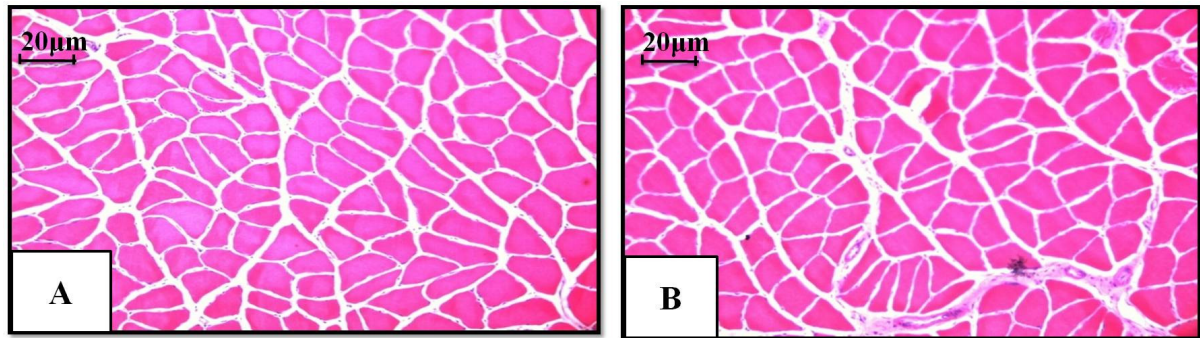


Fig. 2. Histological sections of SOL (A) and PL (B) muscle from one representative animal of each group.

Histochemical analysis. Muscles sections (12 μ m thick) obtained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica Germany) were submitted to myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) reaction after preincubation at pH 4.1, 4.52 and 10.6 for PL and at pH 4.2, 4.32 and 9.8 for SOL muscles. Muscle fiber types were classified as Types I, IC, IIC, and IIA in SOL and I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID and IIB in PL muscles (Fig. 8) (Staron et al., 1999). Muscle fiber-type percentages were determined using an Image Analysis System Software (LeicaQWin Plus, Germany).

Biochemical analysis. Myosin heavy chain (MHC) isoforms analysis was performed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in duplicate (maximum 5% of variation) (Fig. 3). Twelve histological sections (12 μ m thick) were collected from each sample and placed in a solution (0.5 mL) containing glycerol 10% (w/vol), 2- mercaptoethanol 5% (vol/vol), and sodium dodecylsulfate (SDS) 2.3% (w/vol) in a Tris/HCl buffer 0.9% (pH 6.8) (w/vol). The final solution was stirred for 1 minute and heated for 10 minutes at 60 °C. Eight microliters of the extracts were submitted to electrophoresis reaction (SDSPAGE 7–10%), using a 4% stacking gel, for 19 to 21 hours at 120V. The gels

were stained with Coomassie Blue (Bar & Pette, 1988) to identify the MHC isoforms according to their molecular weight showing bands at the MHCI, MHCIIa, MHCIIx/d and MHCIIb levels (Figure 7A and B). The gels were photographed and the images were captured by VDS Software (Pharmacia Biotech). The relative MHC isoforms content was determined by the densitometry from the bands corresponding to each MHC isoform, using Image Master VDS Software (Empresa, version 3.0). These results were expressed in arbitrary units as optical density X band area.

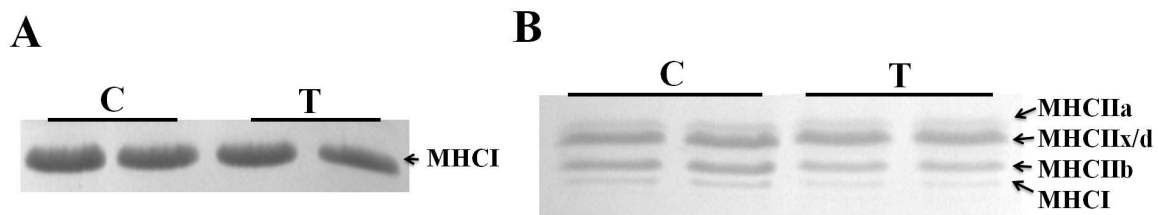


Fig. 3. Electrophoretic separation of myosin heavy chain (MHC) isoforms of SOL (A) and PL muscle (B) from one representative animal in each group: C: control group and T: trained group.

RNA isolation and analysis

RNA extraction. Total RNA was extracted from muscle samples using TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Total RNA amounts were determined using a NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280nm OD ratio around to 2.0. Total RNA (2 µg) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) to remove any possible genomic DNA present in the samples. The RNA structural integrity was assessed by capillary electrophoresis by using a bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) calculating the RNA Integrity Number (RIN), the average RIN value for all samples was 8.7 ± 0.3 (scale 1–10), indicating high-quality RNA with minimal degradation.

cDNA synthesis. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using High Capacity cDNA archive kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocols. A sample without reverse transcriptase (NoRT) was used to verify DNase treatment

efficiency. Each reaction had 10 μ L of 10X Reverse Transcription Buffer, 4 μ L of 25X dNTPs, 10 μ L of 10X random primers, 100 units of RNase inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 250 units of Reverse Transcriptase MultiScribe™, and the final volume was adjusted to 100 μ L with nuclease-free water. And cDNA synthesis reaction conditions were: 10 minutes at 25°C for primers annealing and 2 hours at 37°C for reverse transcription. Reaction control was made by omission of the reverse transcriptase enzyme. All cDNA samples were amplified by PCR to ensure that there was no contamination by DNA. The resulting cDNA samples were aliquoted and stored at -20°C.

Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR).

The target and reference gene expression levels were detected by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain Reaction (RT-qPCR) using an ABI 7300 Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). For each reaction, two microliters of cDNA (20 ng/ μ l) corresponding to 20ng/ μ L, were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), and 400 nM of each primer (Table 1), in a final volume of 25 μ L. Reaction controls without cDNA template were used to verify that the master mix was free from contaminants possible contamination of reagents. Real time conditions were: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1min. The reactions were performed in duplicate using 0.4 μ M of each primer and 2 X Power SYBR Green PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RT-qPCRs for target and reference genes were run using two replicates of each animal. The specificity of each primer was confirmed by the presence of a single peak in the dissociation curve analysis.

Primer pairs for all genes were designed from the *Rattus norvegicus* sequences published in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) using Primer Express 3.0 software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Primers were synthesized by the Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) (Table 1).

The PCR efficiency of each assay was determined by creating standard curves for the target and reference genes. For each gene, standard curves were obtained by using a serial of ten-fold dilutions of PCR product diluted 500 times. The PCR product was amplified using the same cDNA stock for all genes. From the standard curves generated by the software, the linearity and efficiency from RT-qPCR reactions were determined for each gene. The

analysis of all standard curves showed high linearity ($R^2=0.99$) and slopes around -3.32 which corresponds to the efficiency of 100 % (User Bulletin # 2, Applied Biosystems, 2001).

Prior to the final quantification of target genes expression, it was also necessary to perform the correction of experimental variability between different samples, for example, amount of RNA and reverse transcription reaction efficiency. Data normalization for at least three reference genes is the most accepted method to avoid such disparities (Vandesompele et al., 2002). The choice of appropriate genes is crucial for reliable results, and the expression level of these genes must remain unchanged for different experimental conditions (Vandesompele et al., 2002). The expression stability of reference genes glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-actin (ACTB) and TATA box binding protein (TBP) (Table 1) was assessed through geNorm VBA applet for Microsoft Excel (Vandesompele et al., 2002). The Ct values obtained from the RT-qPCR plates were transformed to quantities. From this raw data, not yet normalized, the software calculated a normalization factor by the geometric mean of the three reference genes. The normalized target genes levels were calculated by dividing the raw target gene quantity for each sample by the appropriate normalization factor (Vandesompele et al., 2002).

Table 1. Sequence of RT-qPCR primers used in the study

Genes	GenBank Accession Number	Sequence (5' – 3')
IGF-I	NM178866	F: GCTATGGCTCCAGCATDCG R: TCCGGAAGCAACACTCATCC
CaN A	D90035.1	F: AGGCGATTGATCCCAAGTTG R: GGAAATGGAACGGCTTTCAC
CaN B	D14568.1	F: AGATGGGAAATGAGGCGAGTT R: TCTCATCAGCATCGAAGTGTGA
MSTN	NM019151	F: GGTCCCGGAGAGACTTTGGG R: CGACAGCACCGCGATTC
TBP	NM_001004198	F: TCCCTCCTCTGCACTGAGATC R: GCAGCACAGAGCAAGCAACT
ACTB	NM_031144	F: TCAGGTCATCACTATCGGCAATG R: TTTCATGGATGCCACAGGATTC
GAPDH	AB017801.1	F: TGCACCACCAACTGCTTA R: GGATGCAGGGATGATGTTTC

F: forward primer; R: reverse primer

Protein Expression Analysis. Protein levels of IGF-I, MSTN and CaN from soleus and plantaris muscle were determined by Western Blot technique, using β -actin protein as normaliser.

Muscle samples were homogenized in lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride - PMSF, 0.25 mM Na_3VO_4 , NaCl 150 mM, and Tris-HCl 50 mM pH 7.5). The samples were centrifuged at 11,000 rpm for 20 min, and 50 μ L of homogenate fraction was re-suspended in 25 μ L of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/mL bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M b-mercaptoethanol). An amount of 70 μ g of total protein was fractioned by one-dimensional SDS-PAGE gel (12%), stained with Coomassie blue, to confirm equal loading of each sample. Proteins were transferred from gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Nonspecific binding sites were blocked using the *SNAP i.d.*[®] *Protein Detection System* (Millipore Company, Billerica, MA, USA) with bovine serum albumin solution (BSA) 3% in phosphate-saline buffer (PBS-T: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,1% pH 7,4), for 10 minutes. Membranes were incubated with specific primary antibodies (Tabela 2) diluted in BSA 1% solution for 10 minutes. After 4 wash steps with PBS-T, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used (Table 2). Finally, after 4 wash steps, membranes were submitted immunoreactive protein signals were detected using *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), according manufacturer's recommendations. Signals were captured in a immunoblotting film paper and the bands intensities were quantified using a densitometry analysis software (*Image J software for windows*, version 1.71, 2006, Austria).

Table 2: Primary and secondary antibodies used in Western Blot analysis.

Protein	Primary Antibody	Secondary Antibody	Manufacturer
IGF-I	C-20 (sc-7144)	donkey anti-goat IgG-HRP/ sc-2020	Santa Cruz Biotechnology California, USA
Myostatin	C-20 (sc-6884)	donkey anti-goat IgG-HRP/ sc-2020	
Calcineurin A	ab3673	Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - Fc (HRP) (ab97200)	ABCAM
Calcineurin B	CN-b1 (ab49658)	Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgM - mu chain (HRP) (ab97230)	
β -actin	R-22 (sc-130657)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	Santa Cruz Biotechnology California, USA

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a software package (SPSS for Windows, version 13.0). To ensure that the data were stable, the statistic procedure was accomplished after the preliminary study of the variable related to normality and equality of variance among all groups, with statistical power of 80% for the comparisons performed. Fiber-type frequency data were analyzed using the Goodman Test for contrasts intermultinomial and intramultinomial populations (Goodman, 1964; Goodman, 1965) to assess differences among all groups. Statistical comparisons among the groups were made using Student t test for body weight, food intake, muscle weight, mRNA and protein expression. For MHC isoforms content values was made the Mann-Whitney test (Zar, 1999). Data are expressed as mean \pm SD. Differences were considered significant with a p value of < 0.05 .

RESULTS

Body weight and food intake. Throughout the experiment, the body weight evolution of the groups and the final average body weight are shown in Fig. 4 and Table 3, respectively. Confirming that animals initiated the experiment with similar health status, no significant ($p > 0.05$) difference was observed in the initial body weight among the groups (Table 3). However, after 8 weeks of aerobic training, was observed reduction of the final body weight in the trained group ($p < 0.05$) in compared with the control group (Fig. 4 and Table 3). Consistent with these results, aerobic training did not promote significant ($p > 0.05$) alteration in food intake in the T group compared to the C group, respectively (Fig. 5).

Table 3. Initial and final body weight in experimental groups.

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)
C	378.9 ± 14.2	421.8 ± 12.7 ^a
T	377.8 ± 12.1	405.8 ± 12.4 ^{aB}

Values are means ± SD. n= 8 rats per group. C: 8 weeks control; T: 8 weeks trained. ^aSignificant difference compared to their initial body weight at $p < 0.05$. ^BSignificant difference compared to final body weight of group control at $p < 0.05$

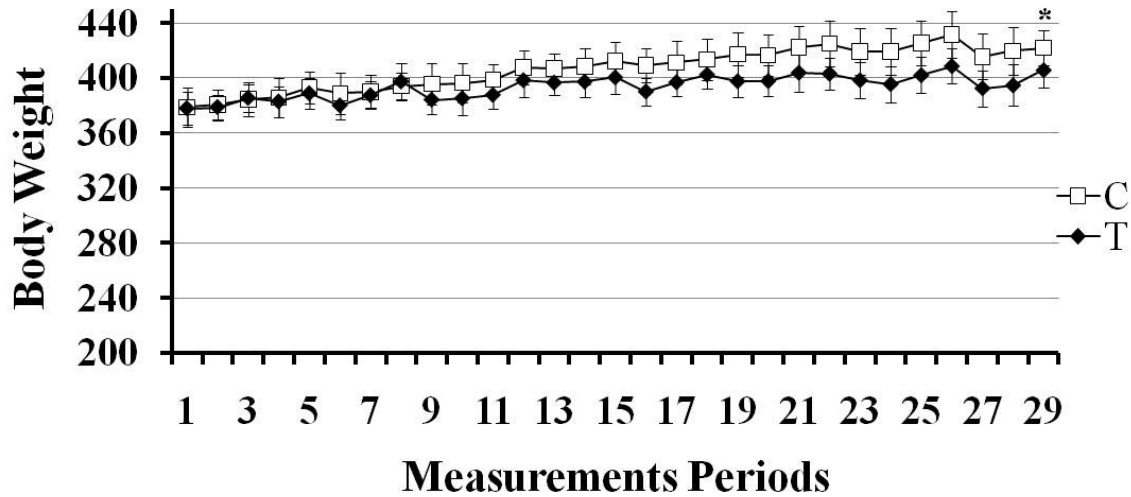


Fig. 4. Body weight evolution during the experiment. The measurements were undertaken every two days from the first to the last day of training period. C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n= 8$ rats per group. Significant differences between the groups were observed in the last day of experiment; $p > 0.05$

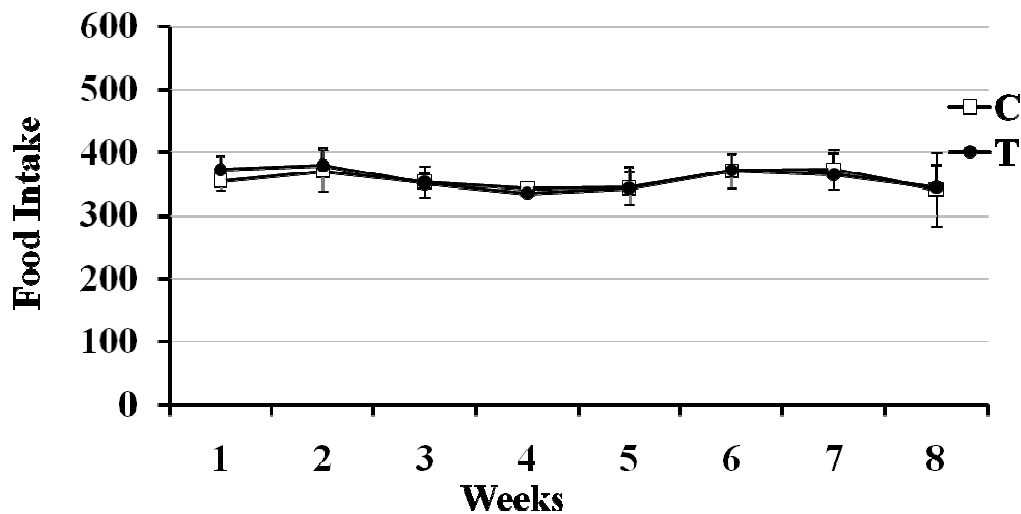


Fig. 5. Food intake during the experiment. The measurements were undertaken every two days from the first to the last day of training period. C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n= 8$ rats per group. No significant differences among groups were observed; $p > 0.05$.

Muscle fiber cross-sectional area (CSA) and muscle weight. A representative Hematoxylin and Eosin (HE) staining used to measure the muscle fiber cross-sectional area

(CSA) is shown in Fig. 2 and the corresponding data are presented in Figure 6A-B. After 8 weeks of the training, in both SOL and PL muscles, there was no significant difference ($p > 0.05$) in muscle fiber CSA in the T group compared to C group (Fig. 6E-F). Consistent with the muscle fiber CSA values, both SOL and PL muscles weight and muscle weight/body weight ratio were not statistically different ($p > 0.05$) in T compared to C group (data not shown).

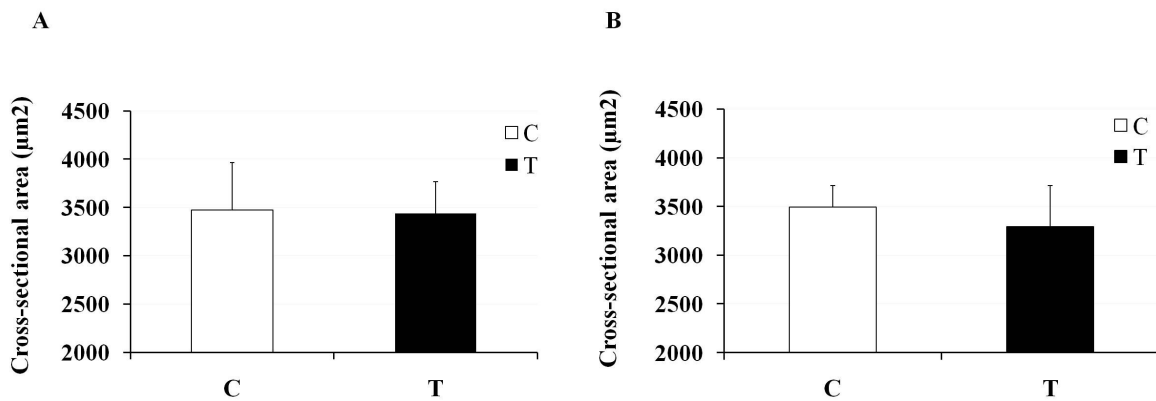


Fig. 6. Muscle fiber cross-sectional area of SOL (A) and PL (B) muscles. C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n = 8$ rats per group. No significant differences among groups were observed; $p > 0.05$.

MHC content and fiber-type frequency. The representative SDS-PAGE gel used to quantify the MHC isoforms is shown in Fig. 7A, and the corresponding data are summarized in Table 4. Aerobic training promoted a significant ($p < 0.05$) decrease in MHCIIb content of the PL muscle with reciprocal increase in MHCIIa in the T group, compared to the C group (Table 4). In addition, the experiment did not promote any change in MHC content in the SOL muscle (data not shown).

Table 4. Relative myosin heavy chain (MHC) I, IIA, IID and IIB isoforms percentages from PL muscle samples determined using sodium dodecylsulfate- polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE)

GROUPS	I	IIA	IID	IIB
C (n=8)	12.5 (16.4-11.6)	16.8 (20.9-11.8)	26.8 (29.8-19.5)	42.1 (49.4- 41.4)
T (n=8)	12.7 (14.2-8.1)	21.7 (22.2-18.6)*	36.6 (51.1-23.0)	27.2 (34.4-22.2)*

*Values are median (maximum – minimum values). n= 8 rats per group. C: control group and T: trained group. *Significant difference compared to C group at $p < 0.05$.*

Muscle fiber-type frequencies for each group are shown in Fig.7C and D, and the corresponding mATPase histochemistry used for fiber-types characterization is shown in Fig. 8. In PL muscle, the significant ($p < 0.05$) increase of MHCIIa content and reduction of MHCIIb ($p < 0.05$) in the T group (Table 3) reflected a significant ($p < 0.05$) increase in type IIA fibers and reduction of type IIB fibers percentages compared to the C group (Fig. 7D). Besides, the mATPase histochemistry did not show any significant alteration in hybrid fiber types (Fig. 7D). In SOL muscle, the aerobic training promoted significant reduction ($p < 0.05$) in type I fibers with an increase in percentages of type IIA fibers of (Fig. 7C). There was no alteration in the percentage of hybrid fiber types in SOL muscle (Fig. 7C). Besides, no change in MHC content (data not shown).

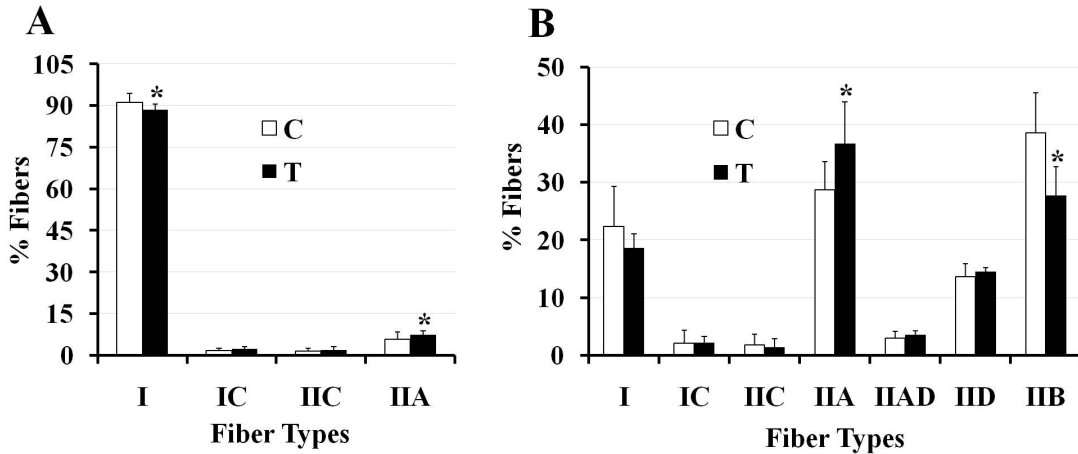


Fig. 7. Frequencies of SOL muscle fiber I, IC, IIC and IIA in A, and PL muscle fiber I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID and IIB in B. Control (C) and Trained (T) groups. Values are means \pm SD. $n = 8$ rats per group. *Significant difference compared to C group at $p < 0.05$.

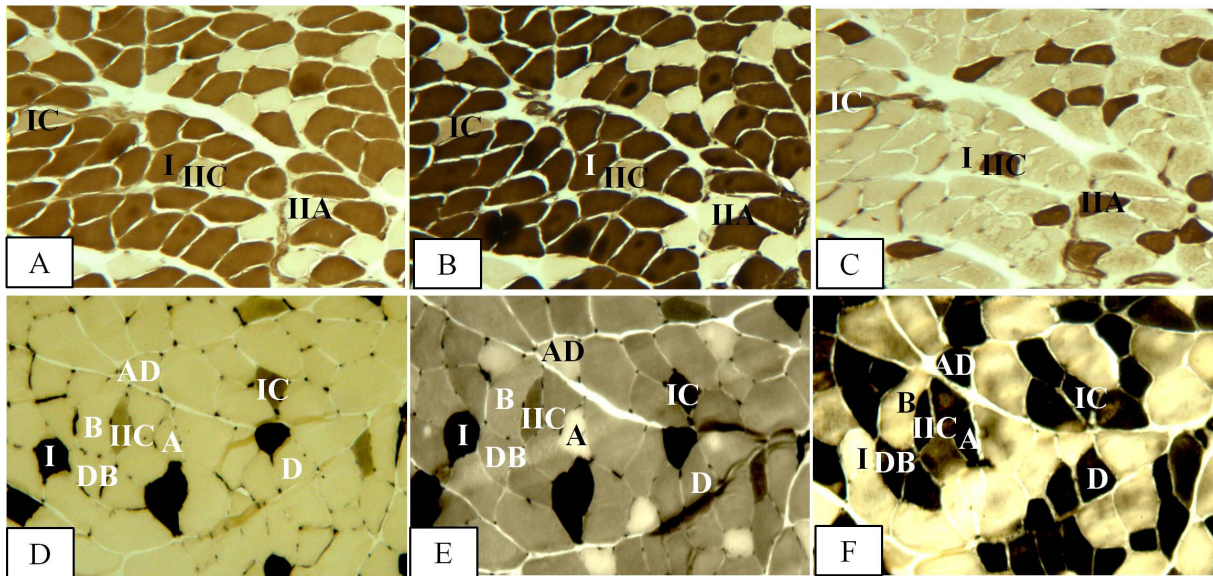


Fig. 8. Serial cross sections of SOL (A-C) and PL (D-F) muscle samples taken from a representative control animal showing fiber-type distribution using myofibrillar adenosine triphosphatase histochemistry after preincubation at pH 4.1 (A), 4.52 (B), 10.6 (C), 4.2 (D), 4.32 (E) and 9.8 (F). *I*, type I fiber; *IC*, type IC fiber; *IIC*, type IIC fiber; *A*, type IIA fiber; *AD*, type IIAD fiber; *D*, type IID fiber; *DB*, type IIDB fiber and *IIB*, type IIB fiber.

CaN A, CaN B, MSTN and IGF-1 expression. Aerobic training during 8 weeks did not induce significant change ($p > 0.05$) in CaN A, CaN B, MSTN and IGF-1 mRNA (Figs. 9 and 10) and protein (Figs. 11 and 12) expression in SOL and PL muscles between the groups. Comparing the CaN A protein expression between SOL and PL muscles, in SOL, the expression was higher (Fig. 13).

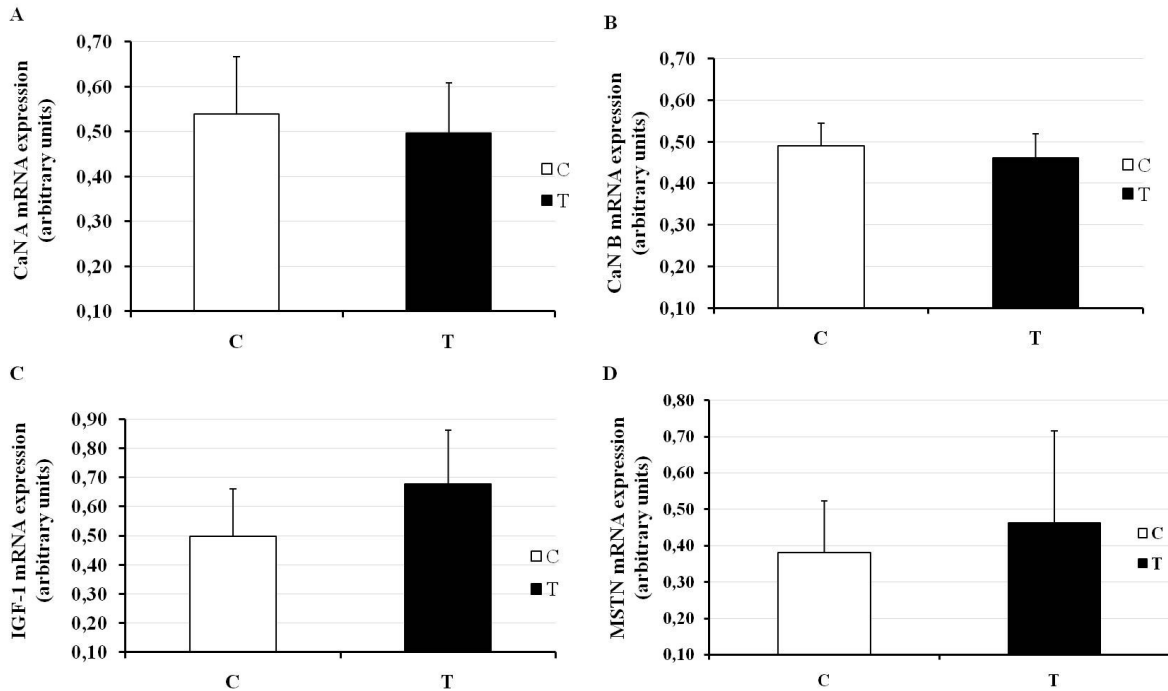


Fig. 9. CaN A (A), CaN B (B), IGF-1 (C) and MSTN (D) mRNA expression in the SOL muscle of all experimental groups: C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n = 8$ rats per group. No significant differences among the groups were observed; $p > 0.05$.

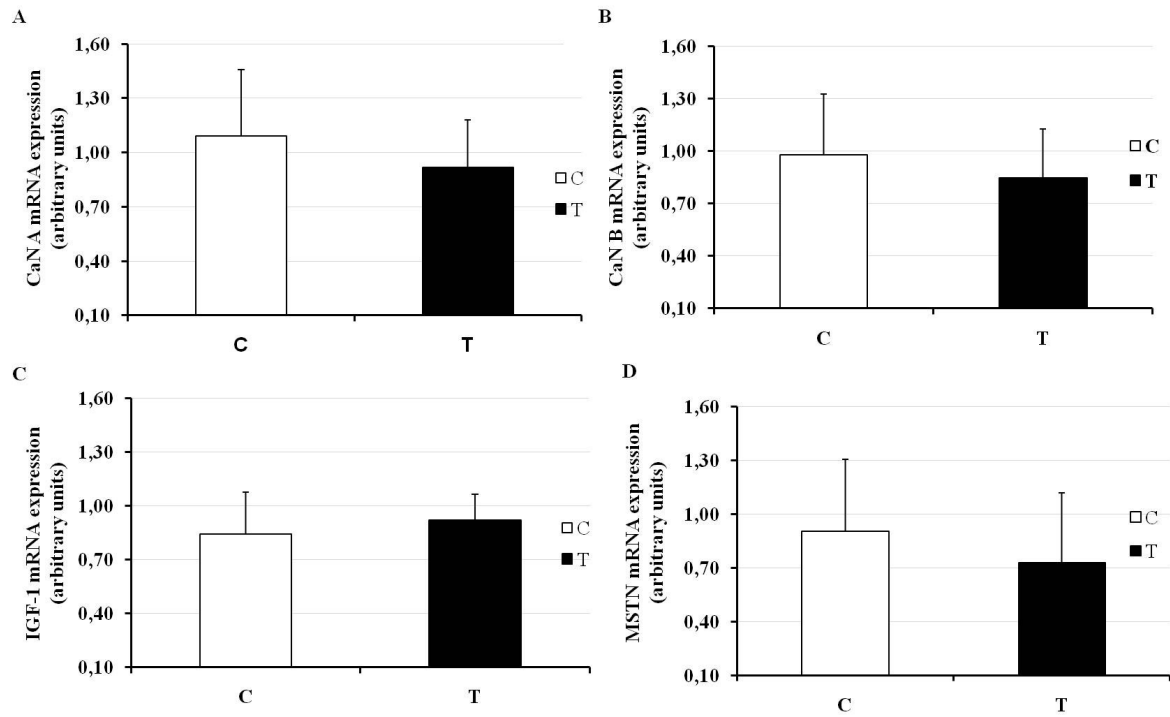


Fig. 10. CaN A (A), CaN B (B), IGF-1 (C) and MSTN (D) mRNA expression in the PL muscle of all experimental groups: C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n = 8$ rats per group. No significant differences among the groups were observed; $p > 0.05$.

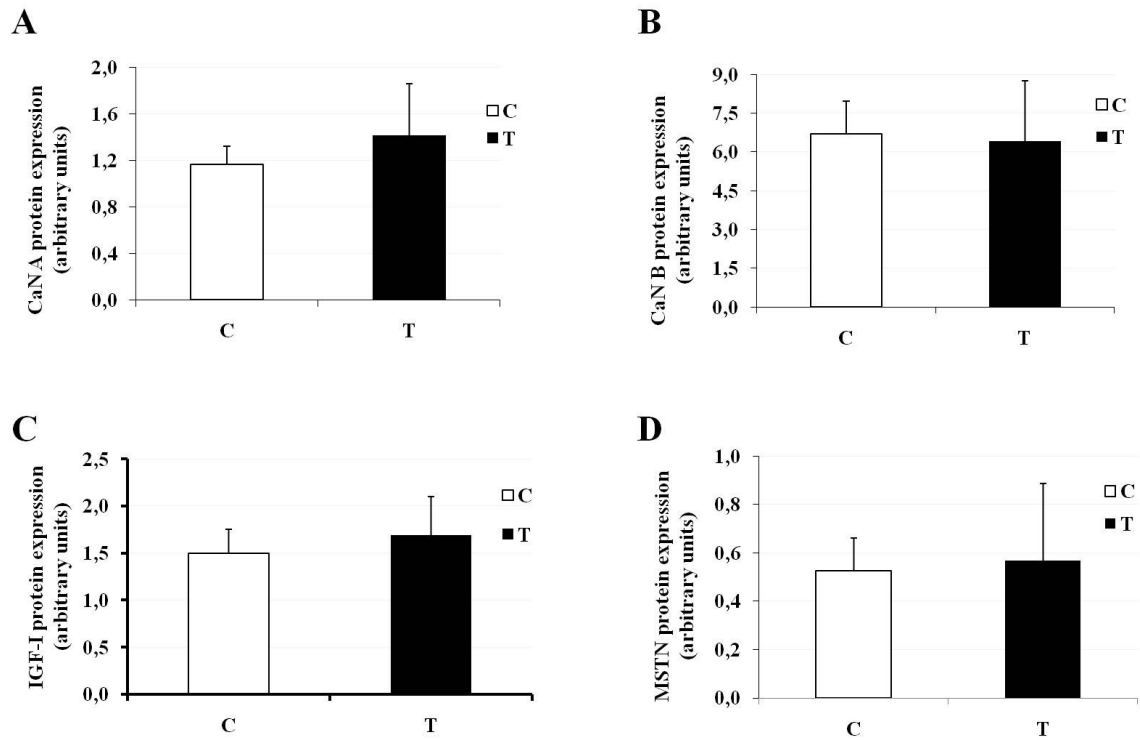


Fig. 11. CaN A (A), CaN B (B), IGF-1 (C) and MSTN (D) protein expression in the SOL muscle of all experimental groups: C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n = 8$ rats per group. No significant differences among the groups were observed; $p > 0.05$.

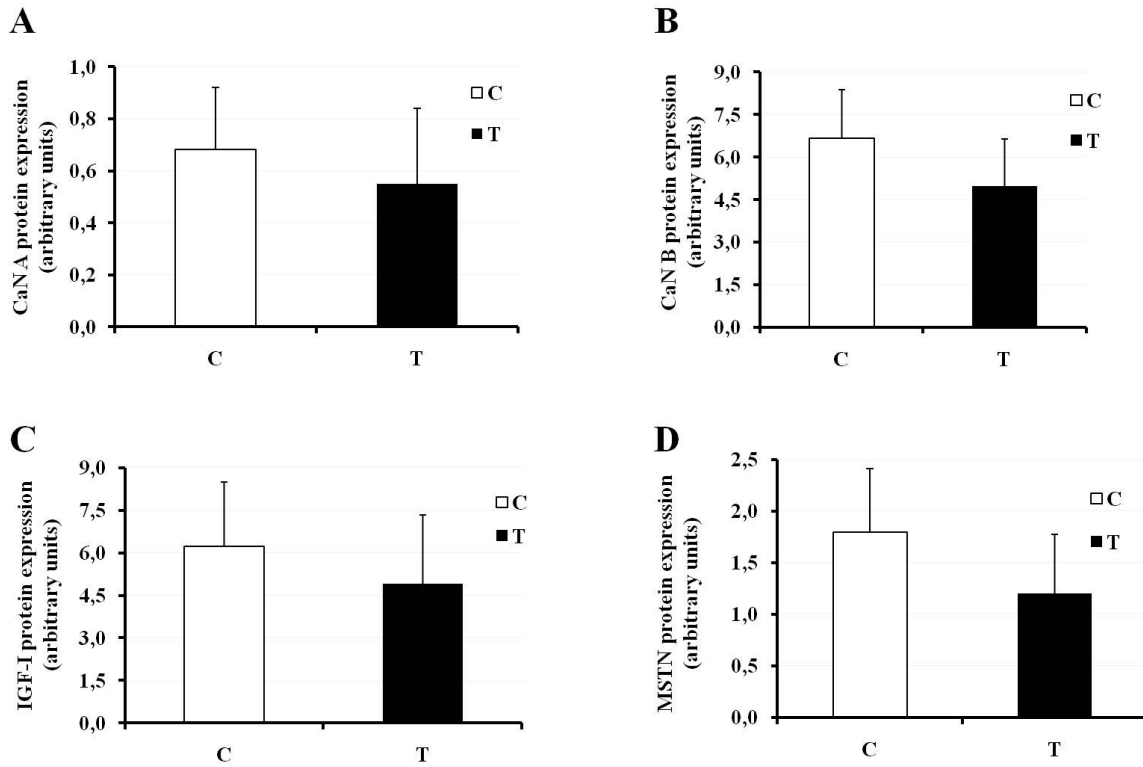


Fig. 12. CaN A (A), CaN B (B), IGF-1 (C) and MSTN (D) protein expression in the PL muscle of all experimental groups: C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n= 8$ rats per group. No significant differences among the groups were observed; $p > 0.05$.

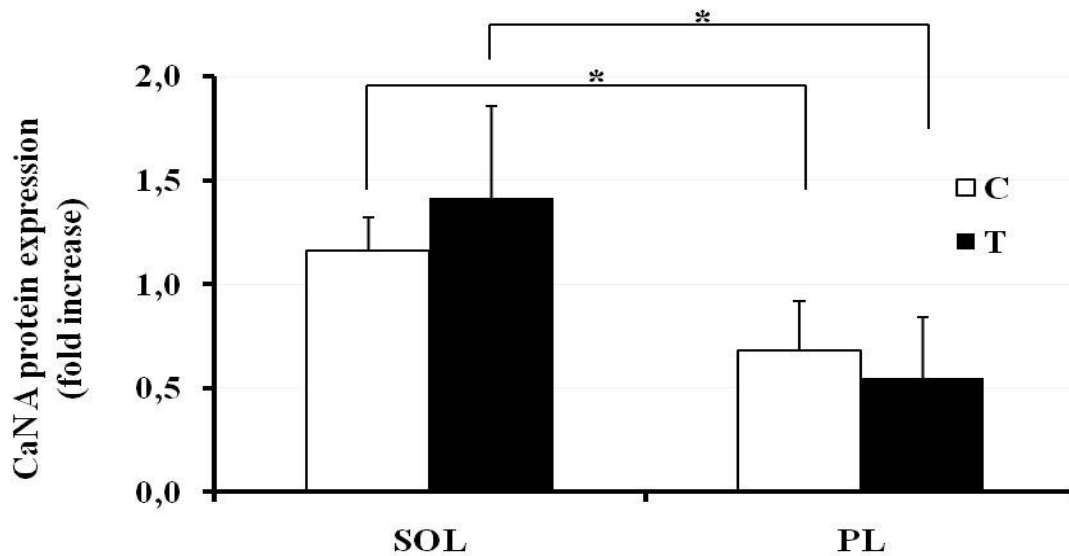


Fig. 13. Western Blot analysis of CaN A proteins levels in SOL and PL muscles: C: control group and T: trained group. Values are means \pm SD. $n= 8$ rats per group. *Significant difference compared to SOL muscle at $p < 0.05$.

DISCUSSION

Although it is well described that aerobic training promote phenotypic changes or adaptations in skeletal muscle, most of these studies used acute models of training to verify these changes (Tunstall et al., 2002; Penkowa et al., 2005; Pilegaard et al., 2005; Benziene et al., 2011). In addition, the influence of this training on hypertrophic control mechanisms has been poorly understood compared with that in resistance training. For this reason, the purpose of this study was to test the hypothesis that muscle phenotypic changes that occur during long-term aerobic training is regulated by myogenic growth factors responses. The major finding was that long-term aerobic training induce muscle change toward a more fast and oxidative in SOL muscle and more oxidative in PL muscles without alter the myogenic growth factors expression; also, this training did not promote muscle hypertrophy.

In the present study, we observed a decrease in MHCIIb and an increase in MHCIIa isoform content associated with a decrease in type IIB and increase in type IIA muscle fibers frequency in PL muscle; in SOL muscle, this training did not promote any alteration in MHC isoform content, although there was an increase in type IIA and a decrease in type I muscle fibers frequencies. Our results are, in part, similar to that observed in others experiments involving aerobic training (O'Neill et al., 1999; Gondret et al., 2005; Gronnard et al., 2008), which generated a continuous increase of the muscle oxidative/slow phenotype. However, the magnitude of muscle responses to aerobic training is dependent on the intensity, the training frequency and the exercise type (Gondret et al., 2005; Pilegaard et al., 2005; Gronnard et al., 2008). In our study, the aerobic training program promoted adjustments among the fast fibers population in PL muscle to adjust them toward the more oxidative/slow muscle; SOL muscle presented a modulation for a faster characteristic although no change in MHC content occurred, fact that can be explained because SOL muscle is constituted by approximately 90% of MHC I isoform. The data from both SOL and PL muscles, strongly suggest that the aerobic training for 8 weeks promoted a beneficial adaptation of the muscle fibers towards a phenotype functionally and metabolically more efficient, independent of the muscle morphofunctional characteristics.

In spite of the transition between the fast fibers population to a more oxidative phenotype is well established in training programs (Campos et al., 2002; Pilegaard et al., 2005; Gronnard et al., 2008; Kesidis et al., 2008), the results regarding the modulation of the fast toward slow or slow toward fast phenotype remain contradictory. Demirel et al. (1999)

observed the adaptation of muscle fiber after aerobic training (running at 75% VO₂max, 4 to 5 days per week) in rats trained 30 (G1), 60 (G2) and 90 minutes (G3) per day. After 10 weeks of training, MHCIIb isoform content decreased accompanied with an increase in MHCIIa isoform content in PL muscle of training groups. Soleus muscle in G2 and G3 groups presented a decrease in MHCIIa with an increase of the MHCI. Aguiar et al. (2010) also observed a shift in slow toward fast feature in SOL muscle with an increase in MHCIIa and decrease in MHCI, after 8 weeks of resistance training. Collectively, our results in relation to SOL muscle together with these, suggest that metabolic and contractile properties of muscles should be coordinately regulated during myofiber shift to the functional adaptation requirements imposed on the muscles.

The adaptation mechanisms of skeletal muscle phenotypic profile in response to training programs are poorly understood. Previous studies have shown a positive correlation between muscle fiber types, MHC isoforms and Calcineurin (CaN) expression (Parsons et al., 2003; Grondard et al., 2008; Lamas et al., 2010). CaN is a calcium-sensitive serine/threonine phosphatase and has been implicated to enhance the transcription of slow fiber specific genes, promoting skeletal muscle fiber transition to a slower phenotype (Olson & Williams, 2000). Bigard et al. (2000), in a experiment using cyclosporin A (an inhibitor of CaN) showed that CaN pathway co-regulates a set of multigenic protein families involved in the transition between slow oxidative (type I) to fast oxidative (type IIa) phenotype in SOL muscle. Activated CaN dephosphorylates several proteins, including NFAT. Chin et al., 1998 examined the DNA sequence of slow and fast fibers promoter regions and identified a NFAT binding sequence in slow type fibers, which was absent in the fast promoter region; these NFAT-binding sequence could be involved in up- or down- regulation of muscle specific genes.

In our study there were no changes in CaN expression after 8 weeks of training in both SOL and PL muscles. Interestingly, the MHC isoforms and muscle fibers-type frequency changed the phenotypic profile in these muscles. Corroborating to our findings, Grondard et al. (2008), showed that after long-term aerobic training (running and swimming) CaN expression did not alter, although there was a shift in MHC isoforms toward to more efficient phenotypic in PL (IIB–IIA) muscle, in both training programs: 12 weeks of running and 6 weeks of swimming. SOL muscle showed an increase in IIA muscle fiber during 6 week of swimming and a change in (IIX-I) muscle fiber occurred during 12 weeks of running.

However, the authors also showed that CaN activity increased only after a single bout of exercise in the muscles studied. In our experiment, although the CaN expression did not change in both muscle studied, we speculate that an initial exercise-induced stimulation of CaN activity occurred and it was able to promote the SOL (I to IIa) and PL (IIb to IIa) muscle fiber transition. Grondard et al. (2008) argue that the continuity of aerobic training can promote an inhibition of CaN, observed by an increase of MCIP1 expression, a modulatory CaN interacting protein.

Calcineurin is a heterodimeric phosphatase protein comprised of a calmodulin-binding catalytic A subunit and a Ca²⁺ binding regulatory B subunit (Klee et al., 1979). In the present study, SOL muscle showed a higher expression of the catalytic CaN (CaN A) in comparison to PL muscle in the groups. Adult's muscles phenotype is maintained by different electric stimulation patterns on the MHC isoforms expression (Ausoni et al., 1990) and the slow phenotype results from continuous nerve stimulation. Dolmetsch et al. (1997) revealed that the activation of the transcription factor NFAT is enhanced by sustained low amplitude elevation of internal calcium that occurs in slow muscle or can be induced by sustained stimulation of fast muscle. Our results in line with those of others (Dunn et al., 1999) support the idea that CaN can mediate the effects of nerve activity in the muscle studied. We speculate that the early acute response of high CaN A expression in SOL muscle of trained group could have promoted the transition from slow oxidative to fast oxidative phenotype observed in this study; moreover, the early acute response of low expression of CaN A in PL muscle of trained group enabled this muscle change from fast glycolytic to fast oxidative phenotype.

The long-term aerobic training did not change IGF-I and MSTN expression in SOL and PL muscles. As these myogenic growth factors are involved with the muscle hypertrophic responses, our results are not surprising considering that previous studies showed that aerobic training promotes little or no change in muscle mass (Manetta et al., 2003; Grandys et al., 2008); this training is more effective promoting mitochondrial biogenesis, increase in oxidative enzymes (Hawley, 2002) and oxygen uptake at submaximal exercise (Trappe et al., 2006). On the other hand, some studies showed that aerobic training promote an increase in protein synthesis in thigh muscles for up to 72 h postexercise (Sheffield-Moore et al., 2004; Miller et al., 2005; Wilkinson et al., 2008); this happened in mitochondrial proteins and not in myofibrillar content. In addition, these studies used acute models of training and did not analyze gene expression of growth factors involved in muscle hypertrophy.

IGF-I have been indicated as a potential mediator of hypertrophy in response to different physiological conditions (Glass, 2003; Goldspink, 2005). The importance of IGF-I in promoting muscle hypertrophy was demonstrated in studies that monitored the increased expression of IGF-I accompanied with an enhance in muscle mass (Goldspink, 1995; Phelan & Gonyea, 1997). In addition, Burke et al. (2008) observed an increase in IGF-I expression in line with an increase in muscle fibers CSA after 8 weeks of resistance training and supplementation with creatine. Then, in the present work, the long-term aerobic training (8 weeks) did not alter the IGF-I expression in both muscle studied, fact that corroborates our result related to the absence of muscles hypertrophy. Surprisingly, during the experiment, the body weight decreased, although the food intake did not change. These findings could infer that long-term aerobic training may possibly promote a reduction of the fat mass, as demonstrated by Hopps & Caimi (2011).

MSTN acts as a growth factor that functions to negatively regulate muscle development and growth (Fedoruck & Rupert, 2008). Welle et al. (2007) reported significant increase in mouse muscle mass (up to 25%) after using the CreLox system to *knock out* the MSTN gene in mature muscle, demonstrating the importance of MSTN in muscle mass regulation. In humans, resistance training suppressed MSTN expression (Roth et al., 2003; Raue et al., 2006) and allows muscles to grow in size (Matsakas & Diel, 2005). Some studies showed that aerobic training induced a decrease of MSTN mRNA expression and an increase in the muscle fiber CSA (Kim et al., 2005; Matsakas et al., 2005). In our study, long-term aerobic training did not promote changes in MSTN expression accompanied by no increase in muscle fiber cross sectional area. Matsakas et al. (2005), showed that after short-term aerobic training there was a decrease in MSTN mRNA expression only in muscles with higher contents of type II muscle fiber (gastrocnemius and vastus lateralis), with no change in the SOL muscle (which contains predominantly type I muscle fiber). The authors argue that MSTN is modulated with differential responses among the muscles. Differently of these results, our data show no alteration in MSTN expression in both PL and SOL muscles, fact that could be explained by the training protocol used (long-term aerobic training).

Based on the results of the current study, we conclude that CaN A differentially regulates slow and fast muscle phenotype. Moreover, the training program adopted did not induce muscle hypertrophy and did not alter CaN, IGF-I and MSTN expression. These

myogenic growth factors are closely related to the control of the muscle mass, more than with muscle phenotype in response to long-term aerobic training.

ACKNOWLEDGMENTS

Grant support: FAPESP, Proc. n° 2009/01623-6 and 2009/53004-8. This work is part of the M.Sc. Thesis presented by Ivan José Vechetti Júnior to State University of São Paulo, UNESP, Bioscience Institute, in 2011.

REFERENCES

- Adams GR and McCue SA.** 1998. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J Appl Physiol* 84: 1716-1722.
- Aguiar AF, Aguiar DH, Felisberto AD, Carani FR, Milanezi RC, Padovani CR and Dal-Pai-Silva M.** 2010. Effects of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain (MHC) expression in rat skeletal muscle fibers. *J of Strength Cond Res* 24(1): 88-96.
- Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T.** 1990. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J Neurosci* 10:153–160.
- Bar A and Pette D.** 1988. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 235:153.
- Barton-Davis ER, Shoturna DI and Sweeney HL.** 1999. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 167(4):301-305.
- Benziane B, Widegren U, Pirkmajer S, Henriksson J, Stepto NK, Chibalin AV.** 2011. Effect of exercise and training on phospholemman phosphorylation in human skeletal muscle. Ahead of print
- Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V and Ventura-Clapier R.** 2000. Calcineurin Co-regulates Contractile and Metabolic Components of Slow Muscle Phenotype. *J Biol Chem* 275(26):19653-60.
- Booth FW, Tseng BS, Fluck M, Carson JA.** 1998. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand* 1998: 162: 343–350.
- Burke DG, Candow DG, Chilibeck PD, MacNeil LG, Roy BD, Tarnopolsky MA and Ziegenfuss T.** 2008. Effect of creatine supplementation and resistance-exercise training on muscle insulin-like growth factor in young adults. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18(4):389-98.
- Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray T, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, and Staron RS.** 2002. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88: 50-60.
- Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE.** 1999. Skeletal muscle Myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol* 277:R601–R6.

- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R and Williams RS.** 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12: 2499-509.
- Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della Barbera M, Angelini A, Betto DD, Germinario E, Vescovo G.** 2004. Beneficial effects of GH/IGF-I on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 C138-C144.
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, and Coombes JS.** 1999. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. *J Appl Physiol* 86: 1002-1008.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC and Healy JI.** 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858.
- Dunn SE, Burns JL, Michel RN.** 1999. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 274:21908–21912.
- Favier FB, Benoit H, and Freyssenet D.** 2008. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* 456: 587-600.
- Federeck MN and Rupert JL.** 2008. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy? *J Med Sci Sports* 18:123–131.
- Fluck M and Hoppeler H.** 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146: 160-161.
- Glass DL.** 2003. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trend Mol med* 9(8):344-350.
- Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA and Kokubun E.** 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130(1):21-7
- Goldspink DF, Cox VM, Smith SK, Eaves LA, Osbaldeston NJ and Lee DM.** 1995. Muscle growth in response to mechanical stimuli. *Am J Physiol* 268:E288-E297.
- Goldspink G.** 2005. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiol* 20:232-238.
- Gondret F, Combes S, Lefaucheur L, Le Bret B.** 2005. Effects of exercise during growth and alternative rearing systems on muscle fibers and collagen properties. *Reprod Nutr Dev.* 45(1):69-86.

- Goodman LA.** 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat* 35: 716-725.
- Goodman LA.** 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7: 247–254.
- Grandys M, Majerczak J, Duda K, Zapart-Bukowska J, Sztefko K and Zoladz JA.** 2008. The effect of endurance training on muscle strength in young, healthy men in relation to hormonal status. *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 7:89-103.
- Grondard C, Biondi O, Pariset C, Lopes P, Deforges S, Lécolle S, Gaspera BD, Gallien CL, Chanoine C, Charbonnier F.** 2008. Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *J Cell Physiol.* 214(1):126-35.
- Gulve EA, Rodnick KJ, Henriksen EJ and Holloszy JO.** 1993. Effects of wheel running on glucose transporter (GLUT4) concentration in skeletal muscle of young adult and old rats. *Mech Ageing Dev* 67, 187–200.
- Hawley JA.** 2002. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29(3): 218-222.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM and Wolfman NM.** 2003. Regulation of myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 17, 1144–1154.
- Hopps E and Caimi G.** 2011. Exercise in obesity management. *J Sports Med Phys Fitness.* 51(2):275-82.
- Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, Tracy BL, Lemmer JT, Hurlbut DE, Martel GF, Siegel EL, Fozard JL, Jeffrey-Metter E, Fleg JL and Hurley BF.** 2000. Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, M641–M648.
- Joulia-Ekaza D and Cabello G.** 2006. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physio-pathological aspects. *Exp Cell Res* 312: 2401–2414.
- Kesidis N, Metaxas TI, Vrabas IS, Stefanidis P, Vamvakoudis E, Christoulas K, Mandroukas A, Balasas D, and Mandroukas K.** 2008. Myosin heavy chain isoform distribution in single fibers of bodybuilders. *Eur J Appl Physiol* 103: 579-583.

- Kim JS, Cross JM and Bamman MM.** 2005. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1110–E1119.
- Klee CB, Crouch TH and Krinks MH.** 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 6270–3.
- Lamas L, Aoki MS, Ugrinowitsch C, Campos GE, Regazzini M, Moriscot AS and Tricoli V.** 2010. Expression of genes related to muscle plasticity after strength and power training regimens. *Scand J Med Sci Sports* 2:216-25
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J and Salehian B.** 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol* 285, E363–E371.
- Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F and Anastasi G.** 2004. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14: 17-21.
- Manetta J, Brun JF, Fedou C, Maimoun L, Prefaut C and Mercier J.** 2003. Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-binding proteins-1 and -3 in middle-aged and young athletes versus sedentary men: relationship with glucose disposal. *Metabolism*. 52(7):821-6.
- Matsakas A and Diel P.** 2005. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. *Int J Sports Med* 26: 83–89.
- Miller BF, Olesen JL, Hansen M, Dossing S, Crameri RM, Welling RJ, Langberg H, Flyvbjerg A, Kjaer M, Babraj JA, Smith K and Rennie MJ.** 2005. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J Physiol* 567: 1021–1033.
- O'Neill DS, Zheng D, Andersen WK, Dohm GL, and Houmard JA.** 1999. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R414–R419.
- Olson EN and Williams RS.** 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 22: 510-519.
- Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF, and Molckentin JD.** 2003. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A_α and A_β gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* 23: 4331–4343.

- Penkowa M, Keller P, Keller C, Hidalgo J, Giralt M, Pedersen BK.** 2005. Exercise-induced metallothionein expression in human skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 90: 477–486.
- Peters D, Barash IA, Burdi M, Yuan PS, Mathew L, Fridén J and Lieber RL.** 2003. Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. *J Physiol* 553, 947–957.
- Pette D and Staron RS.** 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.
- Pette D and Staron RS.** 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115: 359-372.
- Phelan JN and Gonyea WJ.** 1997. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat Rec* 247:179-188.
- Pilegaard H, Osada T, Andersen LT, Helge JW, Saltin B, Neufer PD.** 2005. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Metabolism* 54: 1048–1055.
- Rao A, Luo C and Hogan PG.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and Function. *Annu Rev Immunol* 15:707–47.
- Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C and Trappe S.** 2006. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J Appl Physiol*. 101(1):53-9.
- Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF and Rogers MA.** 2003. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med* 228:706–709
- Schulte JN and Yarasheski KE** 2001. Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11, S111–S118.
- Scott W, Stevens J and Binder-Macleod SA.** 2001. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys Ther* 81(11): 1810-6.
- Sharman MJ, Newton RU, Triplett-McBride T, McGuigan MR, McBride JM, Häkkinen A, Häkkinen K, Kraemer WJ.** 2001. Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60- to 75-year-old men and women. *Eur J Appl Physiol* 84: 127-32.

- Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Volpi E, Wolf SE, Morio B, Chinkes DL, Paddon-Jones D and Wolfe RR.** 2004. Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E513–E522.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD and Campos GE.** 1999. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111(2):117-123.
- Talmadge RJ, Otis JS, Rittler MR, Garcia ND, Spencer SR, Lees SJ, Naya FJ.** 2004. Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion. *BMC Cell Biol* 5:28.
- Tobin JF and Celeste AJ.** 2005. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Curr Opin Pharmacol* 5: 328–332.
- Trappe S, Harber M, Creer A, Gallagher P, Slivka D, Minchev K and Whitsett D.** 2006. Single muscle fiber adaptations with marathon training. *J Appl Physiol* 101(3): 721-727.
- Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D.** 2002. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E66–E72.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):research0034.
- Walker KS, Kambadur R, Sharma M and Smith HK.** 2004. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 36, 787–793.
- Wehling M, Cai B and Tidball JG.** 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* 14, 103–110.
- Welle S, Bhatt K, Pinkert CA, Tawil R and Thornton CA.** 2007. Muscle growth after post-developmental myostatin gene knockout. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E985–E991.
- Wilkinson SB, Phillips SM, Atherton PJ, Patel R, Yarasheski KE, Tarnopolsky MA and Rennie MJ.** 2008. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J Physiol* 586: 3701–3717.
- Willoughby DS.** 2004. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc* 36, 574–582.
- Zar JH.** 1999. *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.