



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITO DO ALONGAMENTO INTERMITENTE NA EXPRESSÃO
GÊNICA, NA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES E NA
MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM RATOS**

SABRINA PEVIANI MESSA

**TESE DE DOUTORADO
SÃO CARLOS – SP
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**EFEITO DO ALONGAMENTO INTERMITENTE NA EXPRESSÃO
GÊNICA, NA ATIVIDADE DE METALOPROTEASES E NA
MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM RATOS**

SABRINA PEVIANI MESSA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia

Orientadora: Profa. Dra Tania de Fátima Salvini

Apoio Financeiro: FAPESP / Doutorado Direto - Processo número: 05/55773-8

SÃO CARLOS – SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M583ea

Messa, Sabrina Peviani.

Efeito do alongamento intermitente na expressão gênica, na atividade de metaloproteases e na morfologia do músculo esquelético em ratos / Sabrina Peviani Messa. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

100 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Alongamento. 2. Plasticidade Muscular. 3. Reabilitação. 4. Metaloprotease. 5. Expressão gênica. I. Título.

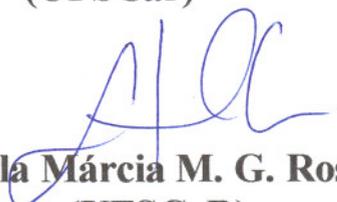
CDD: 615.82 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE Sabrina Peviani Messa, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 10 DE OUTUBRO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



**Tânia de Fátima Salvini
(UFSCar)**



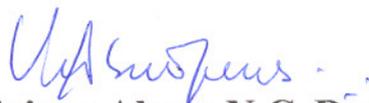
**Stela Márcia M. G. Rosa
(UFSCaR)**



**Elen Haruka Miyabara
(UNICID)**



**Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
(UFScar)**



**Viviane Abreu N.C. Dantas
(USP)**

Agradecimentos

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Pedro e Nide, por apoiarem minhas decisões, e por dividirem os bons e maus momentos comigo e por permitirem a realização dessa importante etapa da minha vida.

Ao meu marido Messa, por todo seu amor e empenho em me ajudar principalmente nas horas mais difíceis. Quanta dedicação, carinho e paciência para me ajudar sempre, mesmo quando ficamos tão distantes. Não esquecerei o apoio que me deu quando estive no Canadá! Gostaria que soubesse que sem seu apoio, talvez eu não tivesse alcançado a realização desse sonho. Meu amor, obrigada por acreditar em mim. Obrigada por estar ao meu lado. Obrigada por ser tão especial!

Aos meus sogros, Sr. Messa e Rosinha, que também estão sempre me incentivando a lutar e seguir meu caminho, sempre torcendo por nós.

À minha amiga Anna Raquel, quanto eu devo a você minha amiga, quantos momentos dividimos juntas, seja em São Carlos, ou em São Paulo. Esse momento gostaria de dividir com você por sempre ser amiga, conselheira, companheira. Nossa, meu primeiro artigo! Quanto devo a você, minha querida. Nunca me esquecerei que sempre acreditou em mim. Saiba que, apesar da distância, estou dividindo esse momento especial com você!

Ao meu amigo Thiago, parece que nossos caminhos estão sempre entrelaçados. Desde quando entrei na graduação, depois o ingresso no mestrado, até o envio de projeto de pós-doc. Nossa parceria sempre deu muito certo e não é à toa que somos "a cabeça e o pescoço". Agradeço por toda sua ajuda nessa etapa em que evoluímos juntos. Espero que nossa parceria e amizade seja para sempre! Te espero no pós-doc! A você, sucesso e felicidade!

Ao meu amigo João (John), que apesar de conseguir falar mais do que eu, se tornou meu grande amigo. Gostaria de pedir desculpas, pois sei que você me conheceu quando eu estava numa fase transitória entre o "posso e não posso". Que orgulho de ser sua amiga. Percebi o quanto você iria fazer falta quando você me disse que iria prestar o concurso de João Pessoa, pois sabia que ia conseguir. Que apesar da distância, sempre continuemos compartilhando os momentos profissionais e pessoais. Desejo a você toda a

felicidade do mundo, e não se esqueça de controlar a ansiedade (ainda bem que conselhos são mais fáceis dá-los do que praticá-los). E espero podermos um dia trabalharmos juntos novamente. Meu amigo, obrigada por tudo!

Ao meu amigo Gabriel (Gabis), apesar do pouco tempo de convivência percebi que você seria um bom amigo. Obrigada por toda ajuda no laboratório! E obrigada pela ajuda no projeto pós-doc, por abraçar o projeto LCA. Espero que nossa parceria colha ótimos frutos no futuro! Obrigada, Gabis.

A todos os companheiros de laboratório: Christiane, Mari, Marcela, Carolina, Esperanza, Bia, Carol, Marcela, Clara, Paula. Obrigada pela paciência!

À Teresa (Teresinha de Jesus), minha grande companheira de laboratório, muito obrigada pela sua ajuda, nossas conversas e tantas risadas. Espero não ter passado despercebido em sua vida.

À amiga Adriana, quantos momentos bons nos nossos cafés, quanta conversa gostosa tivemos juntas. Sempre foi muito bom poder desabafar contigo, e aproveitar pra ver as peraltices da Lulu. Obrigada por tudo e conte sempre comigo.

À amiga Roberta, minha "pupila", minha primeira aluna de iniciação. Que de aluna passou a ser professora de inglês. Obrigada pela disposição e paciência. Sem sua ajuda, meu estágio no Canadá teria sido impossível (e também não me esquecerei do Toefl). E o melhor disso tudo é que nos tornamos amigas! Rô, muito obrigada por tudo.

À amiga Vânia, obrigada por sempre me ouvir e tentar acalmar minha ansiedade. Divido com você meus momentos mais importantes. Obrigada por estar sempre presente na minha vida e por acreditar em mim!

Aos companheiros do laboratório da Profa. Heloísa: Juliana, Raquel, Márcia, Oscar, Renner, Liliana, Carol, Mônica, Carmem, Ritinha, devo a vocês meus primeiros passos no mundo da biologia molecular.

Ao Prof. Verzola, não posso deixar de agradecer a oportunidade de ter iniciado no mundo da biologia molecular através do seu projeto de doutorado. E apesar de me ligar todos os dias pela manhã, mesmo sabendo que estaria em aula, ainda não conheci uma pessoa tão calma e educada como o senhor. Em praticamente três anos de convivência, nunca presenciei uma alteração de voz. Professor, muito obrigada pela inesquecível convivência.

À Profa. Heloísa, não tenho palavras de agradecimento. Nunca me esquecerei do seu convite para estagiar em seu laboratório. Se hoje cheguei aqui é por ter tido essa experiência tão rica. Helô, muito obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório para mim. Se hoje sou fascinada pelo mundo da biologia molecular, devo muito isso a você. Muito obrigada por tudo!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, por terem me ensinado tanto e ajudado na minha qualificação.

À FAPESP, que sem seu apoio financeiro seria impossível a realização desse trabalho.

Agradecimento Especial

À Profa Tania de Fátima Salvini

Tania, primeiramente, é um orgulho ser sua aluna. Todo meu crescimento e amadurecimento científico, eu devo a você: desde a elaboração do meu primeiro resumo em congresso, do meu primeiro artigo, até a elaboração dos projetos. Tania, nunca me esquecerei de nossas conversas, principalmente as informais (aquelas na hora do café no PQ, ou na sua casa com todo o pessoal do laboratório), pois sempre trouxeram um grande crescimento pessoal. Obrigada por fazer interessar-me pelos assuntos políticos. Serei eternamente grata pela insistência no estágio no exterior. Você sabe que relutei muito sobre esse assunto, pois não me sentia preparada para embarcar nessa experiência tão inusitada para mim. Mas quanto crescimento profissional, e melhor, quanto crescimento pessoal eu tive com essa viagem. Enquanto eu tinha medo, você acreditou que eu seria capaz. E mesmo com meu inglês "macarrônico", eu fui e consegui. Lá tentei ser verdadeiramente sua aluna, pois tentei tanto aprender os diferentes experimentos no laboratório, como convencer as pessoas do lab para saírem comigo. Digo isso, pois você me ensinou a gostar desse convívio social, e hoje, valorizo muito essa interação profissional-pessoal. Tania, não tenho palavras de agradecimento. Devo todo meu amadurecimento profissional a você. Obrigada pela preocupação profissional, política e pessoal que tem com todos os seus alunos. Orgulho-me de ser sua aluna! Espelho-me em você e gostaria de um dia ser uma profissional tão competente e inovadora quanto. Serei eternamente grata por tudo...

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO.....	9
1.1	Descrição das Atividades Desenvolvidas durante o Doutorado.....	13
2	MANUSCRITO I.....	19
2.1	Resumo	21
2.2	Introdução	23
2.3	Material e Métodos	27
2.4	Resultados	33
2.5	Discussão	39
2.6	Referências Bibliográficas	43
3	MANUSCRITO II.....	49
3.1	Resumo	51
3.2	Introdução	52
3.3	Material e Métodos	55
3.4	Resultados	60
3.5	Discussão	64
3.6	Referências Bibliográficas	67
4	MANUSCRITO III.....	71
4.1	Resumo	73
4.2	Introdução	75
4.3	Material e Métodos	78

4.4	Resultados	87
4.5	Discussão	91
4.6	Referências Bibliográficas	95

CONTEXTUALIZAÇÃO

Esta Tese foi estruturada em forma de artigos científicos, cujo objetivo foi avaliar o efeito do alongamento no músculo esquelético, utilizando-se protocolos freqüentemente utilizados na reabilitação e nas atividades esportivas em humanos.

Está bem descrito na literatura científica, que os músculos esqueléticos dos mamíferos adaptam o comprimento de suas fibras musculares, de acordo com a *posição* na qual é preferencialmente mantido (TABARY et al, 1972; WILLIAMS & GOLDSPIK, 1978). Essa adaptação, de modo geral, é reversível.

Sabe-se também que músculos encurtados/retraídos levam à diminuição da amplitude articular e do desempenho muscular. De modo geral, o encurtamento de grupos musculares leva à reorganização postural do indivíduo, podendo causar alterações funcionais. Desta maneira, o alongamento muscular é um importante recurso, utilizado para aumentar a amplitude de movimento, tanto em indivíduos saudáveis como na reabilitação (GAJDOSIK, 2001). Além disso, o alongamento do músculo esquelético é também um poderoso estímulo para o crescimento muscular e aumento da síntese protéica (GOLDSPIK et al, 2002; GOLDSPIK & HARRIDGE, 2004).

Resultados prévios mostraram que uma sessão diária de alongamento passivo, aplicado durante 30 min consecutivos, previne a perda de sarcômeros em série e a amplitude articular em ratos imobilizados (WILLIAM, 1990). Recentemente identificamos em nosso laboratório, que sessões de 40 min de alongamento muscular, realizadas três vezes por semana em músculos normais, aumentaram o número de sarcômeros em série e a área das fibras, indicando aumento na síntese protéica (COUTINHO et al., 2004).

Programas de alongamento muscular têm sido recomendados e utilizados para prevenção e/ou tratamento dessas alterações posturais. Na área de fisioterapia e nos esportes, têm sido bastante utilizados os exercícios de alongamento onde um grupo muscular é alongado algumas vezes por períodos de curta duração (30 a 60 s), acarretando em ganhos significativos na amplitude articular e no alongamento do músculo. Assim, o primeiro objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de um protocolo intermitente de alongamento na adaptação do músculo esquelético, analisando a expressão gênica da Myo-D, Atrogina-1 e Miostatina e a morfologia muscular.

Outro aspecto relevante na avaliação do músculo esquelético submetido ao alongamento seria verificar atividade de metaloproteases de matriz (MMPs), uma vez que sua atividade se altera durante o remodelamento dos tecidos. As MMPs contribuem tanto no desenvolvimento e funcionamento dos tecidos, como nos processos patológicos. Como elas degradam os componentes da matriz extracelular (MEC), contribuem para o remodelamento da mesma. No músculo esquelético estão envolvidas com os processos de desenvolvimento, isquemia, mionecrose, angiogênese, desnervação, lesões, atrofia, regeneração, miopatias (revisão CARMELI et al, 2004). Assim, o segundo objetivo deste estudo foi analisar o efeito do alongamento sobre a atividade das MMPs, o que auxiliaria compreender a adaptação da matriz extracelular do músculo esquelético frente a este estímulo.

Outra questão terapêutica importante é a adaptação muscular associada ao alongamento frente à desnervação. O músculo desnervado sofre atrofia muscular, degeneração, perda de força e aumento da proliferação do tecido conjuntivo, prejudicando as atividades funcionais. Essa linha de investigação é importante, pois sessões de alongamento muscular, assim como a eletroestimulação, são dois recursos terapêuticos básicos e muito utilizados pelo fisioterapeuta no tratamento de diversas

lesões nervosas periféricas, que acometem o músculo esquelético. Por outro lado, há ainda na literatura muita polêmica em relação à intervenção fisioterapêutica no tratamento do músculo desnervado, particularmente quanto à efetividade dos recursos terapêuticos utilizados para amenizar a perda acentuada de massa muscular.

Estudos recentes do nosso laboratório, realizados em animais experimentais identificaram que tanto a eletroestimulação (RUSSO et al, 2007), como o alongamento muscular (GOMES et al, 2006) são estímulos que alteram a expressão de genes importantes relacionados ao trofismo muscular.

Assim, o presente estudo teve também por objetivo estudar os efeitos de sessões de alongamento e de eletroestimulação no tratamento do músculo esquelético desnervado, investigando a atuação de cada um deles isoladamente, bem como sua associação, na expressão e atividade das metaloproteases de matriz durante a fase inicial da desnervação do músculo tibial anterior (TA) de rato por axoniotmese.

REFERÊNCIAS

1. CARMELI, E; MOAS M; REZNICK AZ; COLEMAN R.. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**. 2004, 29:191-197.
2. COUTINHO, E.L.; GOMES, A.R.S.; FRANÇA, C.N.; OISHI, J.; SALVINI, T. F. The effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**. 2004, 37(12):1853-61.
3. GAJDOSIK, R.L. Passive extensibility of skeletal muscle: review of literature with clinical implications. **Clin Biomech**. 2001, 16:87-101.
4. GOLDSPINK, G., WILLIAMS, P., SIMPSON, H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop**. 2002, 403: 146-152.
5. GOLDSPINK, G. & HARRIDGE, S.D.R. Growth factors and muscle ageing. **Experimental Gerontology**. 2004, 39:1433-38.
6. GOMES A.R.S., SOARES A.G., PEVIANI S.M., NASCIMENTO R.B., MORISCOT A.S., SALVINI T.F. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil**, 87: 241-246, 2006.
7. RUSSO T.L., PEVIANI S.M., FRERIA C.M., GIGO-BENATO D., GEUNA S., SALVINI T.F. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, 35(1):87-97, 2007.
8. TABARY, J.C.; TABARY, C.; TARDIEU,C.; TARDIEU, G.; GOLDSPINK,G. Physiological and structural changes in the cat's soleus muscle due to immobilization at different lengths by plaster casts. **J Physiol**. 1972, 224:231-44.
9. WILLIAMS, P.E. Use of intermittent stretch in the prevention of serial sarcomere loss in immobilised muscle. **Ann Rheum Dis**. 1990, 49: 316-317.
10. WILLIAMS P.E. & GOLDSPINK, G. Changes in sarcomere length and physiological properties in immobilized muscle. **J Anat**. 1978, 459-68.

Descrição das Atividades Desenvolvidas durante o Doutorado

1. Descrição da produção científica no período:

Há vários anos, nosso laboratório tem desenvolvido estudos sobre a adaptação muscular associada ao alongamento e à eletroestimulação, dois recursos amplamente utilizados na reabilitação, contribuindo com a literatura científica nessa área.

Ao ingressar no Mestrado do programa de pós-graduação em Fisioterapia da UFSCar, fui convidada a trabalhar na linha de pesquisa em alongamento muscular coordenada pela Prof. Dra Tania Fátima Salvini. O primeiro projeto de pesquisa que participei, intitulado “O efeito do alongamento muscular na expressão gênica dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs)”, teve como objetivo avaliar o efeito do alongamento no músculo esquelético, utilizando-se protocolos frequentemente utilizados na reabilitação e nas atividades esportivas em humanos. Como resultado desse estudo, houve a publicação do seguinte manuscrito:

- GOMES ARS, SOARES AG, PEVIANI SM, NASCIMENTO RB, MORISCOT AS, SALVINI TF. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006; 87:241-246.

Resumidamente, observou-se o efeito de 30 minutos de alongamento passivo na expressão gênica da myo-D, miostatina e atrogina-1. Particularmente na área de fisioterapia, alguns protocolos clínicos já muito popularizados entre os profissionais (por exemplo, as técnicas de reeducação postural), têm preconizado que uma sessão semanal de alongamento, progressivo e mantido por aproximadamente 30-40 min, resulta em ganhos significativos na amplitude articular e no alongamento do músculo. Pode-se observar que com esse protocolo de alongamento, apenas a myo-D, um gene

relacionado á hipertrofia, e a atrogina-1, um gene relacionado á atrofia muscular, se alteraram.

Posteriormente, com os resultados desse primeiro estudo, foi proposto outro projeto, intitulado “O efeito do alongamento intermitente na expressão gênica, na atividade de metaloproteases de matriz e na morfologia do músculo esquelético do rato”, que deu continuidade ao meu projeto de doutorado direto. Os resultados deste estudo, apresentados no corpo da Tese em forma de artigo científico, permitiram a publicação de um manuscrito e a submissão de outro:

- PEVIANI SM, GOMES AR, MOREIRA RF, MORISCOT AS, SALVINI TF. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:363-370.
- PEVIANI SM, GOMES AR, SELISTRE-ARAÚJO HS, SALVINI TF. MMP-2 is not altered by stretching in skeletal muscle. Submetido à International Journal of Sports Medicine (Agosto de 2008).

Paralelamente, participei de um projeto intitulado “O efeito da eletroestimulação baseada nas modificações de excitabilidade muscular sobre a expressão gênica, variáveis elétricas e área de secção transversa do músculo tibial anterior (TA) desnervado de ratos”. Como resultado desse estudo, houve a publicação de dois manuscritos:

- RUSSO TL, PEVIANI SM, FRERIA CM, GIGO-BENATO D, GEUNA S, SALVINI TF. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogin-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:87-97.

Observamos que poucas contrações (20) induzidas eletricamente no músculo desnervado são capazes de diminuir a expressão de genes (myoD e atrogina-1)

normalmente hiperexpressos no músculo esquelético após a desnervação, contudo a eletroestimulação não foi capaz de deter a atrofia das fibras musculares desnervadas.

- RUSSO TL, PEVIANI SM, DURIGAN JLQ, SALVINI TF. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2008;37:593-600.

Sumariamente, um protocolo clínico de eletroestimulação, utilizando eletrodos de superfície como normalmente empregado na reabilitação em humanos, mostrou que a desnervação aumentou a atividade da MMP-2 e que a eletroestimulação regulou apenas a expressão gênica da MMP-2 do músculo desnervado de rato.

Os resultados desses estudos trouxeram novas questões importantes para o entendimento da eletroestimulação e de outros recursos, como o alongamento, utilizados na reabilitação de indivíduos com lesões nervosas periféricas, uma vez que seus efeitos são pobremente estudados, como no caso do alongamento, quando não controversos, como no caso da eletroestimulação. Dessa forma, foi proposto um novo projeto como objetivo avaliar o efeito da eletroestimulação e do alongamento intermitentes, bem como sua associação, sobre a expressão gênica da MyoD, atrogina-1 e miostatina, atividade de metaloproteases e a área de secção transversa da fibra muscular no músculo TA desnervado de ratos. Como resultados desse projeto, foram elaborados dois artigos científicos, um deles apresentado no corpo da Tese e submetido; e outro em que será submetido em breve a periódico internacional indexado:

- PEVIANI SM, RUSSO TL, DURIGAN JL, VIEIRA BS, PINHEIRO CM, GALASSI MS, SALVINI TF. Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat denervated skeletal muscle. Submetido à Revista *Neurorehabilitation and Neural Repair*, e

- RUSSO TL, PEVIANI SM, DURIGAN JL, SALVINI TF. Electrical stimulation, stretching and their combination regulate differently gene expression in rat denervated muscle.

Além disso, participei como colaboradora em três trabalhos resultantes de três parcerias distintas. O primeiro estudo resultou da cooperação com o grupo de pesquisa da Universidade de São Paulo sob a coordenação do professor Celso Ricardo Carvalho. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes intensidades do treinamento físico aeróbio na expressão gênica e área de secção transversa do músculo tibial anterior, bem como na atividade de metaloproteases do músculo diafragma em camundongos submetidos à inflamação pulmonar alérgica crônica. Os resultados deste estudo foram submetidos a periódicos internacionais indexados:

- Effects of aerobic training on atrophy gene expression in mouse skeletal muscle with chronic allergic lung inflammation. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF. (*Brazilian Journal of Biological and Medical Research*)
- Aerobic physical training increases MMPs activities in diaphragm muscle of mice with chronic allergic airway inflammation. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, Duarte AC, Vieira RP, Martins MA, Carvalho CRF, Salvini TF. (*International Journal of Sports Medicine*)

Na segunda parceria, estudamos, em colaboração com a professora Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo vinculada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, os possíveis efeitos da desintegrina alternagina-C (ALT-C) na regeneração muscular em ratos. Como resultado desse projeto, foi publicado o artigo científico:

- DURIGAN JLQ, PEVIANI SM, RUSSO TL, DELFINO GB, COMINETTI MR, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, SALVINI TF Effects of Alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and metalloproteinase activity in regenerating skeletal muscle. *Toxicol.* 2008, [Epub ahead of print].

Na terceira parceria, estudamos, em colaboração com a professora Viviane Minamoto, vinculada ao Departamento de Fisioterapia da UNIMEP, os efeitos de diferentes intervalos de eletroestimulação no músculo gastrocnêmio desnervado de rato. Como resultado deste estudo, houve a publicação do manuscrito:

- LIMA SC, CAIERÃO QM, PEVIANI SM, RUSSO TL, SOMAZZ MC, SALVINI TF, TEODORI RM, MINAMOTO VB. Muscle and Nerve Responses After Different Intervals of Electrical Stimulation Sessions on Denervated Rat Muscle. *Am J Phys Med Rehabil.* 2008, [Epub ahead of print].

2. Doutorado Sanduíche

No período de 15 de abril a 15 de julho de 2008 tive a oportunidade de realizar um estágio na “York University – School of Kinesiology and Health Science – Toronto-Ontário/ Canadá”, sob orientação da Profa. Dra. Tara Haas. Uma das linhas de pesquisa do laboratório é o desenvolvimento de estratégias para o desenvolvimento de vasos sanguíneos e o possível envolvimento do alongamento nesse processo. Nesse período, desenvolvi vários experimentos na tentativa de investigar o efeito do alongamento em cultura de mioblastos (C2C12) e células endoteliais do músculo esquelético (SMEC) sobre a expressão gênica e protéica do receptor da eritropoietina (Epo-R). A eritropoietina (Epo) é um hormônio glicoprotéico produzido nos seres humanos pelos rins e fígado que tem sido conhecido nas últimas décadas como o principal regulador da

eritropoiese por estimular o crescimento, prevenir apoptose e induzir a diferenciação das células precursoras dos eritrócitos. Há também vários estudos mostrando que a ativação do seu receptor (Epo-R) tem um potente efeito angiogênico, em parte por aumentar a expressão de vários fatores de crescimento angiogênicos e por estimular a proliferação e migração das células endoteliais (Lundby et al., J Appl Physiol 104: 1154-1160, 2008).

Esse estágio no exterior permitiu o domínio de algumas importantes técnicas em biologia molecular de avaliação do tecido músculo-esquelético, bem como em cultura celular, ampliando meu conhecimento sobre novas metodologias de análise do músculo esquelético.

MANUSCRITO I

Artigo Publicado na Revista Muscle and Nerve. 2007, 35:363-370.

CURTAS SESSÕES DE ALONGAMENTO AUMENTAM A EXPRESSÃO GÊNICA DA MYOD, MIOSTATINA E ATROGINA-1 NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS.

Autores:

Sabrina Messa Peviani¹, MS, Anna Raquel Silveira Gomes¹, PhD, Roberta Fátima Carreira Moreira¹, Anselmo Sigari Moriscot², PhD, e Tania Fátima Salvini¹, PhD.

¹ Unidade de Plasticidade Muscular, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil. ² Unidade de Morfologia, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, USP-SP, Brasil.

Agradecimentos

Este projeto recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, SP, Brasil (FAPESP; processo nº 03/10889-3, 01/13523-4, 01/135221-1). Sabrina Peviani Messa é bolsista FAPESP (processo nº 05/55773-8) e Roberta F. C. Moreira do CNPq/PIBIC.

Correspondente: Tania F. Salvini. Tel.: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: tania@power.ufscar.br

Título resumido: Expressão gênica e o músculo alongado

RESUMO

O alongamento muscular é amplamente utilizado na reabilitação e nas atividades esportivas para melhorar a amplitude de movimento e flexibilidade em humanos, porém seu efeito sobre a expressão de genes músculo-específicos não é bem conhecido. Este trabalho analisou o efeito de um programa de alongamento intermitente na expressão gênica da myoD, atrogina-1 e miostatina e na morfologia muscular do músculo sóleo de rato. Foram utilizados 50 ratos Wistar (300g) que tiveram a articulação tibio-társica da pata esquerda posicionada de forma passiva e manual em flexão dorsal máxima para o alongamento do músculo sóleo. Cada sessão consistiu em 10 alongamentos de 1 min de duração e 30s de repouso entre cada repetição. Cinco grupos foram submetidos a uma única sessão de alongamento e avaliados imediatamente (I, n=5), 8h (n=5), 24h (n=5) 48h (n=5), 72h (n=5) e 168h (n=5). Outros três grupos foram avaliados após 2, 3 e 7 sessões diárias de alongamento (n=5), sendo uma sessão realizada diariamente. Um grupo controle (n=5) também foi analisado. Os músculos sóleos esquerdo de todos os animais, foram retirados para avaliação dos níveis de RNAm (RNA mensageiro), por meio da técnica de PCR em tempo real, e histologia para análise da morfologia geral das fibras. Uma única sessão de alongamento aumentou os níveis de RNAm da myoD (após 24h: 1.69 ± 0.4 vezes), miostatina (I: 1.63 ± 0.2 vezes e 168h após: 1.34 ± 0.04 vezes) e da atrogina-1 (após 48h: 3.08 ± 0.48 vezes). Sessões diárias de alongamento aumentaram a expressão da miostatina (após 7 sessões: $1,60 \pm 0,27$ vezes) e da atrogina-1 (após 2: $3,77 \pm 0,5$ vezes; 3: $4,26 \pm 0,6$ vezes e 7 sessões: $3,27 \pm 0,5$ vezes). A morfologia do músculo sóleo não apresentou sinais de lesão em nenhum dos grupos submetidos ao alongamento. Em conclusão, curtas sessões de alongamento são capazes de aumentar a expressão gênica de fatores associados ao crescimento muscular (myoD), a regulação da massa muscular (miostatina) e a atrofia (atrogina-1), indicando o remodelamento muscular por meio de diferentes vias de sinalização.

Palavras-chave: Alongamento; MRFs; Proteína F-box; Reabilitação; Músculo Esquelético.

ABREVIATURA

MRFs: Fatores regulatórios miogênicos

RNAm: Ácido ribonucléico (RNA) mensageiro

myoD: Fator miogênico de diferenciação-1

TFIID: Fator de transcrição II D

PCR: Reação em cadeia da polimerase

INTRODUÇÃO

O alongamento muscular é capaz de prevenir a atrofia, a proliferação do tecido conjuntivo e a perda de sarcômeros em série em músculos submetidos à imobilização (WILLIAMS, 1988; GOLDSPINK et al., 2002). Além disso, o alongamento pode ser também um importante estímulo para o crescimento muscular longitudinal e aumento da síntese protéica (GOLDSPINK et al., 2002), envolvendo a transcrição de genes músculo-específicos. Embora o mecanismo pelo qual o núcleo aumente a transcrição de RNAm específicos do músculo esquelético em resposta a estímulos hipertróficos seja desconhecido, sugere-se que os fatores regulatórios miogênicos (MRFs) estejam envolvidos neste processo (LOWE et al., 1998).

Os MRF's são uma família de fatores de transcrição com estrutura do tipo hélice-alça-hélice (bHLH) que regulam genes músculo-específico como desmina, troponina I e cadeia leve da miosina (PSILANDER et al., 2003), sendo compostos por 4 membros: MyoD (ou Myf-3), Myf-5, miogenina (ou Myf-1) e MRF-4 (ou Myf-6/herculina) (SABORIN & RUDNICK, 2000; MUNTONI et al., 2002). Durante a embriogênese eles são críticos no estabelecimento da linhagem miogênica e no controle da diferenciação dos mioblastos e miofibras (SABORIN & RUDNICK, 2000). Vários trabalhos têm mostrado seu envolvimento no processo de hipertrofia induzida pelo alongamento (LOWE et al., 1998; JACOBS-EL et al., 1995; LOWE & ALWAYS, 1999; ZÁDOR et al., 1999; GOMES et al., 2006).

Embora o alongamento muscular seja conhecido como um estímulo hipertrófico (GOLDSPINK et al., 2002), interessante, alguns estudos têm descrito uma diminuição na área de secção transversa do músculo de ratos submetidos ao alongamento (STAUBER et al., 1994). Um recente estudo em nosso laboratório

também observou resultados semelhantes, onde um alongamento semanal de 40 minutos induziu atrofia muscular, enquanto o comprimento muscular e o número de sarcômeros em série não se alteraram (GOMES et al., 2004). Desse modo, a expressão gênica da atrogina-1 (relacionado à atrofia muscular) e da miostatina (relacionado à regulação da massa muscular) foi investigada.

A miostatina, (fator de crescimento e diferenciação 8, GDF-8) foi identificada por MCPHERON et al., (1997) em camundongo como um membro da superfamília do Fator Transformante do Crescimento β (*TGF- β*), sendo sintetizada pelo músculo esquelético e encontrada no sangue, atuando de modo concentração-dependente como um regulador negativo do crescimento muscular (LEE, 2004). Há uma forte evidência experimental apontando para a função da miostatina como repressor do crescimento muscular (MCPHERON et al., 1997). Estudos mostram aumentos nos níveis de RNAm e proteína da miostatina durante períodos de inatividade muscular (CARLSON et al., 1999; WEHLING et al., 2000), enquanto a expressão da miostatina parece reduzir conforme o músculo volta à atividade (WEHLING et al., 2000). Além disso, o bloqueio e subsequente inibição da miostatina aumentam a massa corporal total, a massa muscular, o tamanho do músculo e sua força (BOGDANOVICH et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2002). Embora seja presumível que a atividade física provavelmente diminua a expressão da miostatina, dois recentes estudos descreveram um aumento nos níveis de RNAm e proteína da miostatina em músculo submetido ao treinamento excêntrico tanto em ratos (PETERS et al., 2003) como em humanos (WILLOUGHBY, 2004). No presente estudo, a miostatina foi investigada na tentativa de determinar se sua expressão é alterada por curtos períodos de alongamento passivo.

A atrogina-1 recebeu essa denominação por ter sido caracterizada como o gene da atrofia, devido ao aumento de sua expressão durante processos que induzem a atrofia

muscular, como sepsis, caquexia provocada por câncer, diabetes mellitus, uremia, privação de alimento, imobilização e desnervação (LECKER et al., 1999; BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001). A atrogina-1 (também conhecida como MAFbx) é constituída por um domínio *F-box*, o qual caracteriza uma classe de proteínas ubiquitina-ligases (E3), e desempenha um papel primordial na ligação da proteína que será ubiquitinada e degradada (LECKER, 2003). Ela é uma proteína nuclear regulatória, de fundamental importância no mecanismo de diminuição da síntese e aumento da degradação de proteínas, no músculo esquelético em processo de atrofia.

Recentemente um estudo do nosso laboratório determinou que sessões diárias de 30 min de alongamento passivo aumentaram a expressão da atrogina-1 (GOMES et al., 2006). Dessa forma, a atrogina-1 pode ser considerada como uma proteína específica para estudar a eventual atrofia muscular associada com alongamento passivo.

Modelos desenvolvidos para investigar o efeito do alongamento na plasticidade do músculo esquelético freqüentemente usam o alongamento crônico, aplicando, por exemplo, a imobilização por gesso (ANSVED, 1995; HARJOLA et al., 2000) ou fita adesiva (WILLIAMS, 1988; GOMES et al., 2006). No entanto, poucos estudos relataram o efeito de curtos períodos de alongamento sobre a expressão gênica no músculo esquelético, tendo todos analisado o músculo sóleo de rato. O primeiro mostrou um aumento na expressão de miogenina após alongamentos repetitivos (15 vezes por minuto durante 4 horas) (IKEDA et al., 2003). O segundo reportou um aumento na miogenina no músculo sóleo submetido a alongamentos repetitivos durante 60 minutos (IKEDA et al., 2004); e o último relatou um aumento na expressão da myoD e atrogina-1 após sessões de 30 minutos de alongamento passivo (GOMES et al., 2006).

Embora estes estudos (GOMES et al., 2006; IKEDA et al., 2003 e 2004) contribuam para o conhecimento sobre o efeito do alongamento na expressão gênica do

músculo esquelético, a maioria deles utiliza longos períodos de alongamento muscular, o que normalmente não é utilizado em seres humanos durante reabilitação ou atividades desportivas. Por outro lado, curtos períodos de alongamento muscular (30 segundos ou 1 minuto) têm sido recomendados para o tratamento de músculos encurtados devido à sua eficácia no ganho de amplitude de movimento e flexibilidade em humanos (BANDY & IRION, 1994; BANDY et al., 1997).

Embora curtas sessões de alongamento sejam recomendadas para humanos, seus efeitos ainda não foram investigados com detalhe. Assim, a hipótese do estudo foi que os genes relacionados com o remodelamento muscular seriam alterados por curtos períodos de alongamento. Baseado nesses fatos, a expressão de três genes foi avaliada no músculo sóleo de rato: myoD, miostatina, e atrogina-1.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

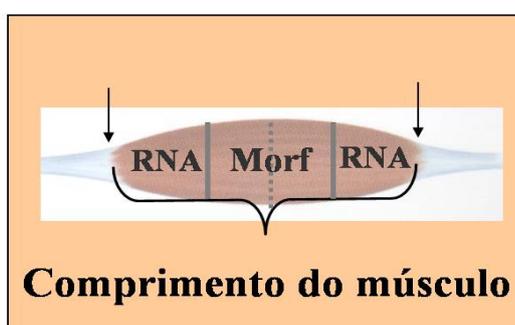
Foram utilizados 50 ratos Wistar, com peso corporal médio de 300 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, e mantidos em biotério próprio do Departamento de Fisioterapia. Eles foram isolados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada. O projeto foi conduzido segundo as normas para experimentação animal definidas pelo Comitê de Ética Animal da UFSCar.

Cada sessão consistiu de 10 de alongamentos, com 1 min de duração cada um e 30s de repouso entre cada repetição. Os animais tiveram a articulação tibio-társica esquerda posicionada de forma passiva e manual em flexão dorsal máxima para o alongamento do músculo sóleo. Cinco grupos foram submetidos a uma única sessão de alongamento e avaliados imediatamente (I, n=5), 8h (n=5), 24h (n=5) 48h (n=5), 72h (n=5) e 168h (n=5). Para avaliar o efeito de sessões repetitivas de alongamento no músculo sóleo ao longo de uma semana, três grupos receberam uma única sessão de alongamento e foram avaliados imediatamente após 2, 3 e 7 sessões (n=5), ou seja, o grupo “2 sessões” foi alongamento diariamente por dois dias consecutivos; o grupo “3 sessões” foi alongamento diariamente por três dias consecutivos e o grupo “7 sessões” foi alongamento diariamente por 7 dias consecutivos. Um grupo controle (n=5), não submetido a nenhum procedimento também foi analisado.

O músculo sóleo foi escolhido por ser uniarticular e por apresentar suas fibras distribuídas de tendão a tendão. Além disso, o músculo sóleo tem sido amplamente utilizado em prévios estudos investigando o efeito do alongamento no músculo

esquelético (COUTINHO et al., 2004, GOMES et al., 2004 e 2006).

Os músculos sóleos da pata esquerda de todos os animais foram removidos, pesados, e cortados em quatro partes iguais no sentido transversal (Esquema 1). Como são controversos os resultados da literatura a respeito da distribuição dos MRFs ao longo da fibra muscular (CARSON & BOOTH, 1998; ZÁDOR et al., 1999; HILL & GOLDSPINK, 2003), a escolha das regiões distais do músculo sóleo para a extração do RNA total, baseou-se em experimentos prévios realizados no laboratório de Morfologia Muscular (ICB-I USP São Paulo), nos quais constatou-se que havia maior expressão da myoD na região distal do músculo, quando comparado com o ventre muscular. Assim, as partes distais de cada músculo foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para avaliação da expressão gênica da myoD, miostatina e atrogina-1, enquanto as porções mediais foram congeladas em isopentano e armazenadas a -80°C para análise da morfologia. Após a retirada dos músculos sóleos, os animais foram eutanaziados com overdose anestésica.



Esquema 1: divisão do músculo sóleo após sua retirada.

Alongamento muscular

Para se efetuar o alongamento passivo no músculo sóleo esquerdo, os animais foram previamente anestesiados com ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) intra peritonealmente. Posteriormente, a articulação tibio-társica foi posicionada em flexão

dorsal máxima para alongamento do músculo sóleo e mantida manualmente nessa posição por 1 minuto, seguido por 30 segundos de intervalo e novamente colocado na posição alongada por 1 minuto, repetindo-se por 10 vezes (Figura 1). Esse modelo de alongamento foi modificado do artigo de IKEDA et al. (2004) e foi escolhido por se tratar de um programa clínico utilizado na reabilitação e no esporte em humanos.

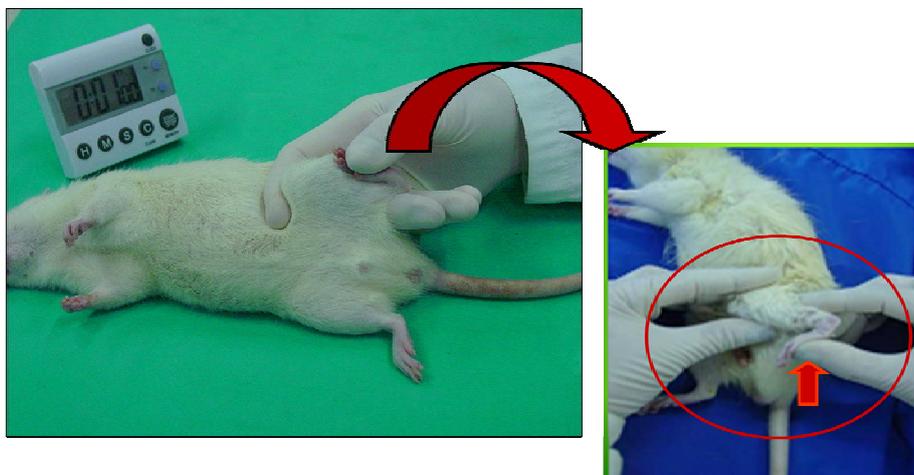


Figura 1- Protocolo de alongamento

Extração de RNA total

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (1,5 μ g de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico).

Transcrição Reversa

A reação da transcrição reversa (RT) contendo 1 µg de RNA total, 1 µl de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5µl) foi incubada à 70°C por 10 min e então resfriada rapidamente em gelo. Adicionou-se a cada amostra uma mistura contendo: 1µl de dNTPmix (deoxynucleotide triphosphate) contendo 0.2 mmol·L⁻¹ de cada dNTP (ATP, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2µl de DTT 0.1 mol·L⁻¹, 4µl de tampão 5x e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min.

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida através da realização de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

Real Time-PCR

As reações em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Applied Biosystems- GeneAmp 5700). As reações foram efetuadas utilizando-se 40ng/µl de cDNA, para todos os genes avaliados, adicionado a uma reação contendo 25µl de SYBR® Green PCR master mix, e as seguintes concentrações de senso e antisenso para cada gene avaliado: 400nM de miostatina; 400nM de atrogina-1 e 300nM de myoD, em uma solução com volume final de 55µl, dividido em dois tubos (duplicata). As condições de ciclagem consistiram em 2 passos: 50°C por 2 min e 95° por 10min, seguido de 40 ciclos com duas etapas, 15s de denaturação à 95°C e 60s de anelamento à 60°C.

Após a reação de PCR, foi possível determinar o início da fase de amplificação exponencial (Ct, *cycle threshold*) de cada amostra, que foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica dos genes myoD, miostatina e atrogina-1.

Primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers, para as reações em cadeia polimerase, estão descritos na Tabela 1: TFIID (utilizado como controle interno), miostatina e atrogina-1, foram construídos utilizando-se o Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA); a sequência da myoD foi obtida de HILL & GOLDSPINK (2003)

Tabela 1: Primers

Primer	Senso	Antisenso
TFIID	CCACCAACTGCTTAGCACC	GCCAAATTCGTTGTCATACC
myoD	GGAGACATCCTCAAGCGATGC	AGCACCTGGTAAATCGGATTG
miostatina	AGTGACGGCTCTTTGGAAGATG	AGTCAGACTCGGTAGGCATGGT
atrogina-1	TACTAAGGAGCGCCATGGATACT	GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT

Os códigos de acesso no GenBank para os genes TFIID, miostatina e atrogina-1, são D01034, AF019624 e AF441120, respectivamente.

Análise Morfológica

Uma das porções mediais do músculo sóleo esquerdo foi submetida a cortes histológicos transversais e seriados (10 µm), em micrótomo criostato, mantido à temperatura de -25°C. As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina (TB) para avaliação morfológica geral das fibras musculares e também foram submetidas à reação de Fosfatase Ácida para avaliar sinais de atividade lisossomal permitindo assim identificar possíveis sinais de necrose (lesão).

Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade, seguido por ANOVA e teste post hoc de Tukey (paramétrico). Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Peso Muscular

Não houve diferença nos pesos dos músculos sóleos entre os grupos avaliados. (Tabela 2).

Tabela 2: Peso dos músculos sóleos.

Grupos	Período de Avaliação	Peso (g)
Controle		0.18±0.004
Alongamento Único	Imediatamente após (I)	0.18±0.005
	8h	0.18±0.004
	24h	0.18±0.004
	48h	0.19±0.005
	72h	0.18±0.005
	168h	0.17±0.007
Alongamento diário	2 sessões	0.18±0.004
	3 sessões	0.17±0.004
	7 sessões	0.18±0.007

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão; n= 5 por grupo.

Morfologia

Os músculos sóleos de todos os grupos apresentaram fibras musculares normais. Nenhum sinal de lesão foi encontrado nos músculos sóleos submetidos ao alongamento (Figura 2).

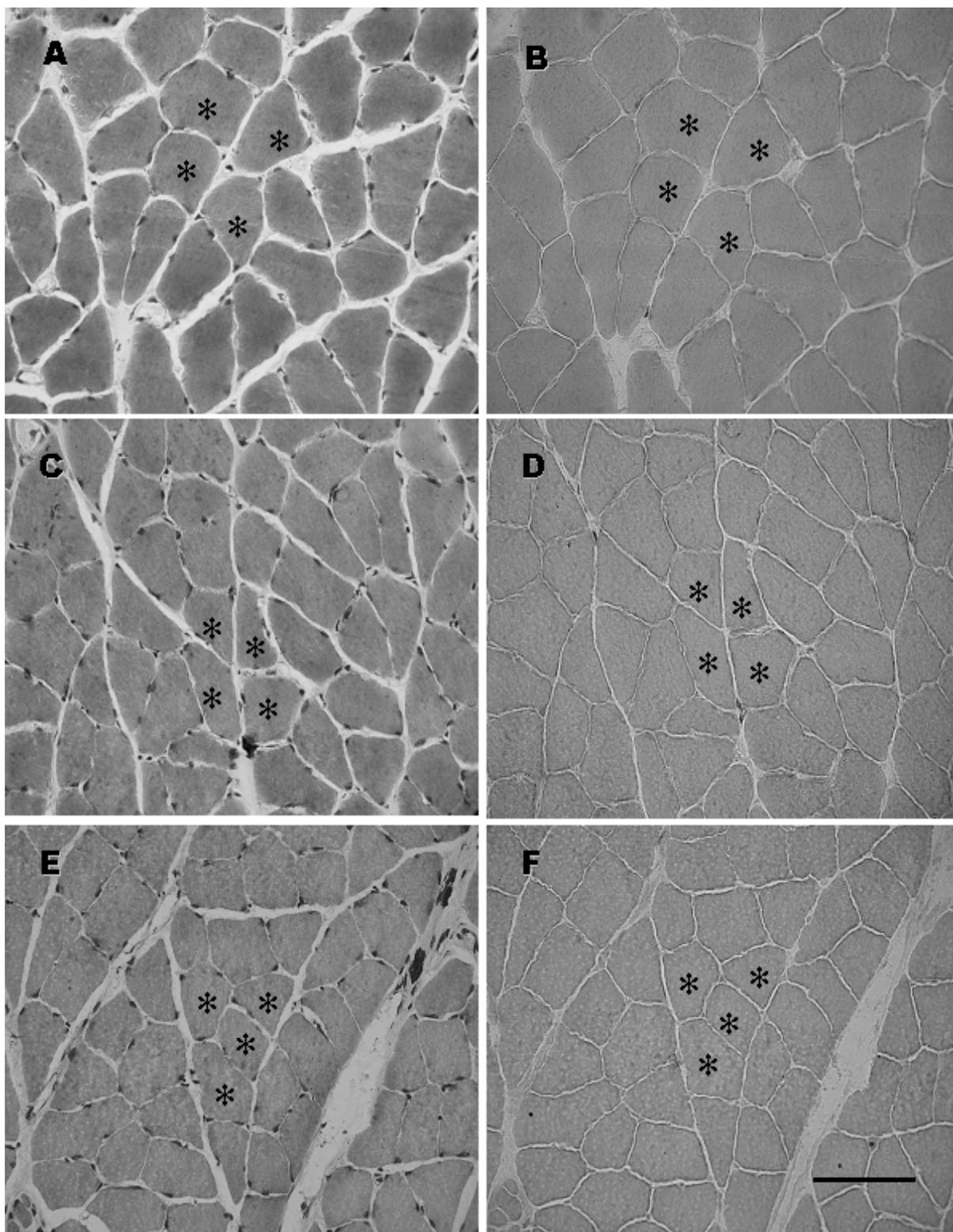


Figura 2 – Cortes transversais seriados do músculo sóleo corado com Azul de Toluidina (A, C e E) e submetido à reação de Fosfatase ácida (B, D e F). A e B: músculo sóleo controle; C e D: músculo sóleo submetido a uma única sessão de

alongamento e avaliado 24h após; E e F: músculo sóleo submetido a sessões diárias de alongamento e avaliado após 7 sessões. Note que todos os grupos apresentaram a fibra muscular normal. Barra: 100 μm . Os asteriscos (*) identificam o mesmo grupo de fibras musculares submetidos à coloração de Azul de Toluidina e a reação de Fosfatase Ácida.

Expressão da myoD

Após uma única sessão de alongamento houve um aumento na expressão gênica da myoD após 24h (1.69 ± 0.4 vezes, $P < 0.05$), quando comparada ao grupo controle. No entanto, não houve alteração da sua expressão após sessões diárias de alongamento (Figura 3).

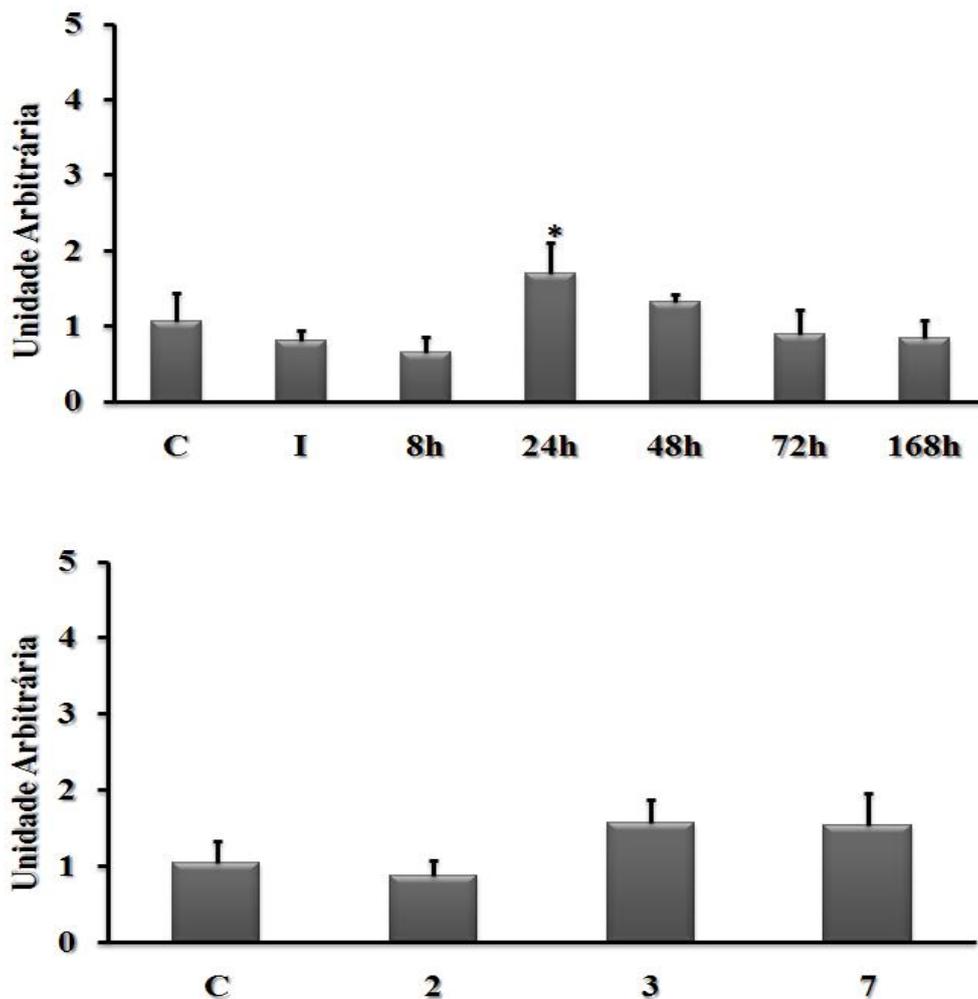


Figura 3 – O efeito do alongamento passivo nos níveis de RNAm da myoD. **A:** Músculo sóleo submetido a uma única sessão de e avaliado imediatamente (I), 8, 24, 48, 72 e 168h. **B:** Músculo sóleo submetido a sessões diárias e avaliado após 2, 3, e 7 sessões.* $P < 0.05$ (ANOVA), quando comparada ao grupo controle (C). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão; $n = 5$ por grupo.

Expressão da miostatina

Um aumento da expressão da miostatina foi encontrado imediatamente após ($1,63 \pm 0,2$ vezes, $P < 0,0005$) e 168h após ($1,34 \pm 0,04$ vezes, $P \leq 0,01$) uma única sessão de alongamento, comparado ao grupo controle. A miostatina também aumentou após 7 sessões diárias de alongamento ($1,60 \pm 0,27$ vezes, $P \leq 0,01$) (Figura 4).

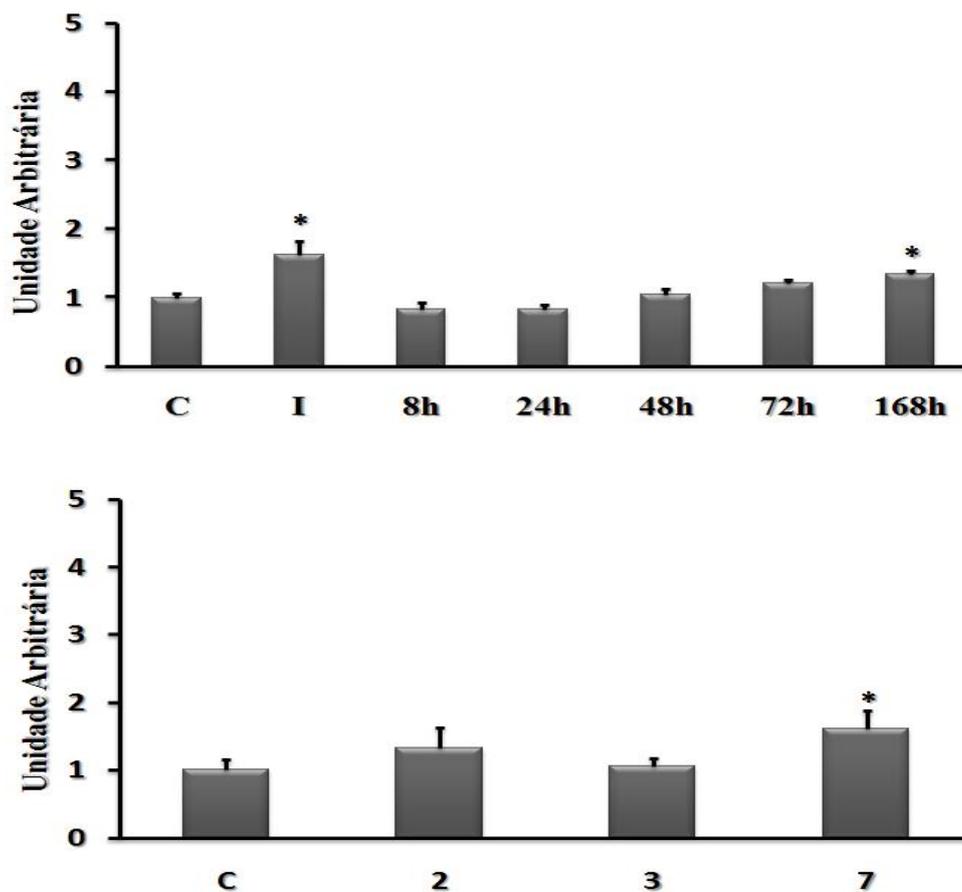


Figura 4 – O efeito do alongamento passivo nos níveis de RNAm da miostatina. **A:** Músculo sóleo submetido a uma única sessão de e avaliado imediatamente (I), 8, 24, 48, 72 e 168h. **B:** Músculo sóleo submetido a sessões diárias de e avaliado após 2, 3, e 7 sessões.* $P < 0,05$ (ANOVA), quando comparada ao grupo controle (C). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão; $n = 5$ por grupo.

Expressão da atrogina-1

Os músculos sóleos apresentaram um aumento na expressão da atrogina-1 48h após uma única sessão de alongamento, quando comparada ao grupo controle. A atrogina-1 também aumentou após 2 ($3,77 \pm 0,5$ vezes, $P < 0,005$), 3 ($4,26 \pm 0,6$ vezes, $P < 0,0005$) e 7 ($3,27 \pm 0,5$ vezes, $P < 0,005$) sessões diárias de alongamento (Figura 5).

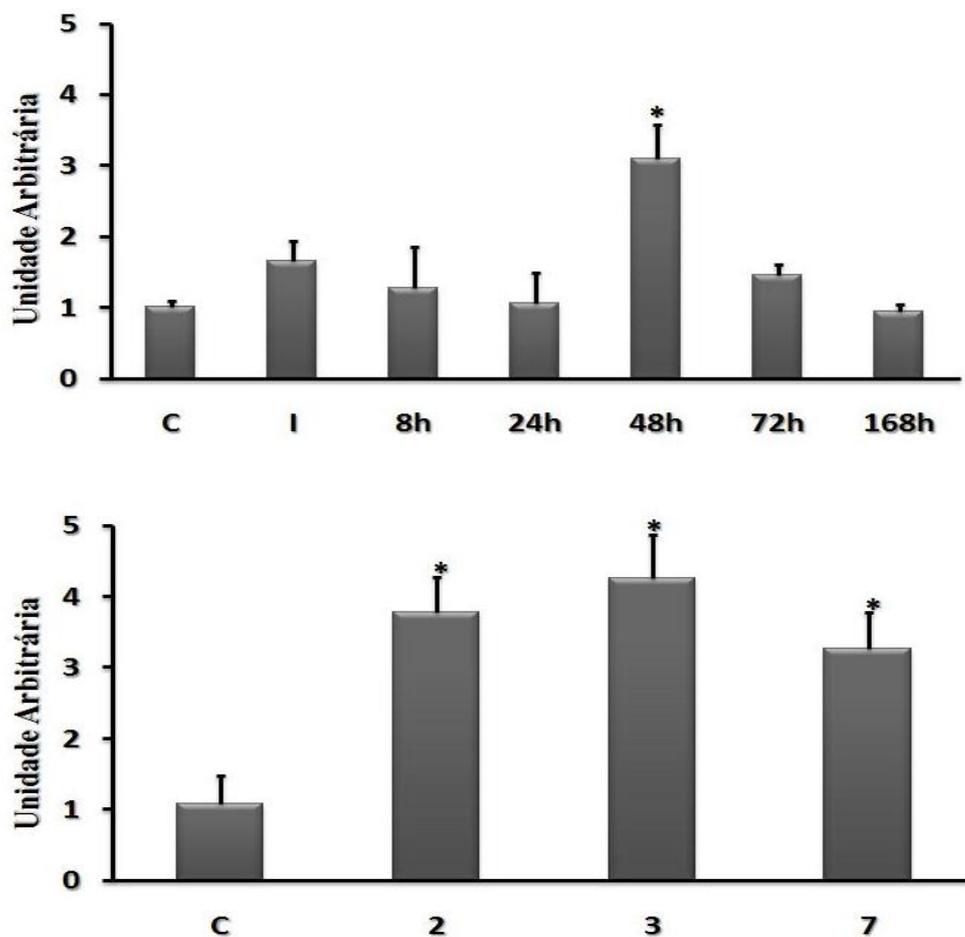


Figura 5 – O efeito do alongamento passivo nos níveis de RNAm da atrogina-1. **A:** Músculo sóleo submetido a uma única sessão de e avaliado imediatamente após (I), 8, 24, 48, 72 e 168h. **B:** Músculo sóleo submetido a sessões diárias de e avaliado após 2, 3, e 7 sessões.* $P < 0,05$ (ANOVA), quando comparada ao grupo controle (C). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão; $n= 5$ por grupo.

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que uma única curta sessão de alongamento (10 minutos no total) é capaz de aumentar a expressão dos três genes analisados, enquanto que várias sessões de alongamento aumentaram apenas a expressão da miostatina e da atroquina-1. Esses resultados indicam que esse programa de alongamento é capaz de estimular o remodelamento muscular por meio de diferentes vias de sinalização. Nosso estudo fornece novas informações sobre a expressão destes genes no músculo esquelético submetidos a curtos períodos de alongamento, semelhante ao utilizado em seres humanos durante a reabilitação e em atividades esportivas para manter ou recuperar a amplitude de movimento e flexibilidade (BANDY & IRON, 1994; BANDY et al., 1997).

Vários trabalhos têm mostrado o aumento da expressão da MyoD (LOWE et al., 1998; LOWE & ALWAYS, 1999; ZADOR et al., 1999; HILL & GOLDSPINK, 2003) quando o músculo é mantido imobilizado em posição alongada. Porém, em todos estes estudos o músculo é alongado por longos períodos de tempo, o que não é normalmente utilizado em humanos na reabilitação e nas atividades esportivas para recuperação ou ganho de flexibilidade.

EPPLEY et al. (1993) identificaram aumento na expressão do *qmf1*, um homólogo da *myoD*, em músculo de frango imobilizado em posição alongada entre 3 a 16h. ZÁDOR et al. (1999) também relatou aumento na expressão gênica da *myoD*, em músculo sóleo de rato, alongado por imobilização durante 3 dias. HILL & GOLDSPINK (2003) verificaram aumento nos níveis de RNAm da *myoD* no músculo tibial anterior de rato mantido por 24h alongado por imobilização e eletroestimulado. Além disso, foi observado que 3h após a realização de 30 contrações excêntricas, a

expressão gênica da myoD apresentou aumento no músculo tibial anterior de rato (PETERS et al., 2003).

A elevação dos níveis de myoD poderia estar relacionada com a proliferação das células satélites (GROUNDS et al., 1992). Tal fato sugere que a elevação nos níveis de RNAm da myoD apresentados nesse estudo pode ter sido decorrente da proliferação das células satélites, a qual se inicia entre 24-48h após estímulos hipertróficos ou em processo de regeneração, induzindo também a expressão de MRFs, como relatado por GROUNDS et al. (1992). Nesse mesmo estudo, ainda observou-se que o pico na expressão gênica da myoD em células mononucleares foi detectado 24h após um estímulo de lesão.

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) está relacionado com o processo de hipertrofia muscular por ativar a via da fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K)-Akt (GLASS, 2003). Foi demonstrado que a interação entre a Rho, uma proteína ligadora de GTP e o fator soro de resposta (SRF), uma proteína ligadora de DNA, participam da via que controla a expressão gênica da myoD. Destaca-se ainda que a ativação Rho/SRF é dependente do IGF (HILL et al., 1995; CARNAC et al., 1998). Assim, pode ser proposto que se o IGF está relacionado com o mecanismo de hipertrofia muscular e a ativação da myoD depende da ativação Rho/SRF, a elevação nos níveis de mRNA da myoD induzida por uma única sessão de alongamento de 10min foi suficiente para produzir um estímulo hipertrófico. Além disso, foi ainda reportado que a indução da via IGF-1/PI3K/Akt impede a indução de mediadores da atrofia, como a atrogina-1 (STITT et al., 2004).

Por outro lado, a expressão da myoD não foi observada com várias sessões de alongamento. Interessantemente, alguns estudo mostram que a miostatina e a atrogina-1 são capazes de regular a expressão da myoD. LANGLEY et al. (2002), demonstraram

que a síntese da myoD pode ser inibida pela miostatina em cultura de mioblastos, sugerindo uma função regulatória negativa sobre a myoD. TINTIGNAC et al. (2005) também relataram que o aumento da expressão da atrogina-1/MAFbx em cultura de proliferação de mioblastos antagoniza a diferenciação, induzindo a degradação da myoD e prevenindo a ativação de genes músculo-específicos. Esse estudo demonstra que a partir de 48h a expressão da atrogina-1 aumenta, enquanto a myoD não se altera. Desse modo, a ausência das mudanças da expressão da myoD com várias sessões de alongamento poderia estar associada ao aumento da expressão da atrogina-1.

Com relação a miostatina, os resultados de sua expressão no músculo esquelético submetido ao estímulo hipertrófico são controversos. Estudo em animais mostraram uma diminuição na expressão da miostatina em reposta ao retorno a atividade após condições de atrofia (MATSAKAS & DIEL, 2005). No entanto, foi demonstrado que o exercício excêntrico induziu um aumento na expressão gênica da miostatina, tanto em ratos (PETERS et al., 2003) quanto em humanos (WILLOUGHBY, 2004), enquanto que o treinamento concêntrico reduziu a sua expressão (ROTH et al., 2003). Esses achados sugerem que o nível de estresse na fibra muscular poder ser determinante na resposta do gene da miostatina. Existe apenas um trabalho avaliando a expressão da miostatina no alongamento, que mostrou que essa proteína não foi alterada após uma sessão de alongamento mantida por 30min (GOMES et al., 2006). Em contraste, nossos resultados mostraram aumentos da miostatina imediatamente após e 168h após uma única sessão de alongamento, assim como após 7 sessões diárias. Embora este um efeito não seja esperado, existem relatos na literatura de estímulos que promovem picos de expressão gênica de caráter bifásico (REHNMARK et al., 1992). Estes efeitos em geral utilizam diferentes mecanismos moleculares. O primeiro pico geralmente ocorre por conta de aumento da taxa de transcrição, e o aumento mais tardio ocorre devido a um

aumento da estabilidade do RNAm.

Estudos prévios têm descrito uma diminuição na área de secção transversa de fibras musculares submetidas ao alongamento do músculo sóleo (STAUBER et al., 1994; GOMES et al., 2004), o que sugere um envolvimento de vias celulares de degradação. Os resultados apresentados nesse estudo confirmam essa hipótese, uma vez que foi observado um aumento na expressão gênica da atrogina-1 e da miostatina quando o alongamento foi realizado diariamente. Porém, a ausência de sinais de lesão muscular nos músculos submetidos ao alongamento associada ao aumento da expressão desses genes sugere que o remodelamento muscular induzido não está associado com lesão muscular.

Provavelmente, o alongamento interfere em ambas as vias hipertróficas e atróficas e também atue diferentemente no crescimento radial e longitudinal do músculo. Nesse sentido, os músculos alongados uma vez por semana apresentaram diminuição na área de secção transversa porém sem alteração no número de sarcômeros em série (GOMES et al., 2004). Isso estaria de acordo com a idéia que esses genes atróficos poderiam também atuar como genes que regulam o crescimento radial e longitudinal da fibra em concordância com outras vias de sinalização celular. Desta maneira, estes genes podem ter um papel mais complexo do que simplesmente induzir sarcopenia em qualquer situação. Assim, estes achados demonstram que existem alguns mecanismos que regulam diferentemente a plasticidade muscular quando o alongamento é realizado.

O presente estudo apresenta novas evidências a respeito do efeito do alongamento passivo realizado em curtos períodos sobre a expressão de genes relacionados com a hipertrofia e com a atrofia muscular.

REFERÊNCIAS

1. ANSVED T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. **Acta Physiol Scand**, 154: 291-302, 1995.
2. BANDY W.D.; IRION J.M.; BRIGGLER M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. **Phys Ther**, 77: 1090-1096, 1997.
3. BANDY W.D.; IRION J.M. The effects of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. **Phys Ther**, 74: 845-852, 1994.
4. BODINE S.C., LATRES E., BAUMHUETER S., LAI V.K., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, 294:1704-1708, 2001.
5. BOGDANOVICH S., KRAG T.O., BARTON E.R., MORRIS L.D., WHITTEMORE L.A., AHIMA R.S., et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. **Nature**, 420:418-421, 2002.
6. CARLSON C., BOOTH F., GORDON S. Skeletal muscle myostatin mRNA expression in fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **Am J Physiol**, 277:R601-R606, 1999.
7. CARNAC G., PRIMIG M., KITZMANN M., CHAFEY P., TUIL D., LAMB N., et al. RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. **Mol Biol Cell**, 9:1891-1902, 1998.
8. CARSON J.A., BOOTH F.W. Myogenin mRNA is elevated during rapid, slow, and maintenance phases of stretch-induced hypertrophy in chicken slow-tonic muscle. **Pflugers Arch**, 435:9850-9858, 1998.
9. COUTINHO E.L.; GOMES A.R.; FRANCA C.N.; OISHI J.; SALVINI T.F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**, 37: 1853-1861, 2004.

10. EPPLEY Z.A., KIM J., RUSSELL B. A myogenic regulatory gene, qmfl, is expressed by adult myonuclei after injury. **Am J Physiol**, 265:C397-405, 1993.
11. GLASS D. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends Mol Med**, 9:344-350, 2003.
12. GOLDSPINK G., WILLIAMS P., SIMPSON H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop Relat Res**, 1: 146-152, 2002.
13. GOMES A.R.S., COUTINHO E.L., FRANÇA C.N., POLONIO J., SALVINI T.F. The effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**, 37:1473-1480, 2004.
14. GOMES A.R.S., SOARES A.G., PEVIANI S.M., NASCIMENTO R.B., MORISCOT A.S., SALVINI T.F. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil**, 87: 241-246, 2006.
15. GOMES M.D., LECKER S.H., JAGOE R.T., NAVON A., GOLDBERG A.L. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98:14440-14445, 2001.
16. GROUNDS M., GARRETT K.L., LAI M.C., WRIGHT W.E., BEILHARZ M.W. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of myoD1 and myogenin probes. **Cell Tissue Res**, 267:99-104, 1992.
17. HARJOLA V.P., JANKALA H., HARKONEN M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affected by testosterone status. **Acta Physiol Scand**, 169: 277-282, 2000.
18. HILL C.S., WYNNE J., TREISMAN R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1 and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. **Cell**, 81:1159-1170, 1995.

19. HILL M., GOLDSPINK G. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. **J Physiol**, 549:409-418, 2003.
20. IKEDA S., YOSHIDA A., MATAYOSHI S., HORINOUCHE K., TANAKA N. Induction of myogenin messenger ribonucleic acid in rat skeletal muscle after 1 hour of passive repetitive stretching. **Arch Phys Med Rehabil**, 85:166-167, 2004.
21. IKEDA S., YOSHIDA A., MATAYOSHI S., TANAKA N. Repetitive stretch induces c-fos and myogenin mRNA within several hours in skeletal muscle removed from rats. **Arch Phys Med Rehabil**, 84:419-423, 2003.
22. JACOBS-EL J., ZHOU M., RUSSELL B. MRF4, Myf5, and *myogenin* m RNAs in the adaptive responses of mature rat muscle. **Am J Physiol**, 268: C1045-C1052, 1995.
23. LANGLEY B., THOMAS M., BISHOP A., SHARMA M., GILMOURS S., KAMBADUR R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating myoD expression. **J Biol Chem**, 277:49831-49840, 2002.
24. LECKER S.H., SOLOMON V., MITCH W.E., GOLDBERG A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. **J Nutr**, 129:227S-237S, 1999.
25. LECKER S.H. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 6:271-275, 2003.
26. LEE S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 20:61-86, 2004.
27. LOUGHNA P.T., BROWNSON C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. **FEBS Lett.** **390**: 304-306, 1996.

28. LOWE D.A., ALWAY S.E. Stretch-induced myogenin, Myo-D, and MRF-4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. **Cell Tissue Res**, 296:531-539, 1999.
29. LOWE D.A., LUND T., ALWAYS S.E. Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. **Am J Physiol**, 275:C155-C162, 1998.
30. MATSAKAS A., DIEL P. The growth factor myostatin, a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis. **Int J Sports Med**, 26:83-89, 2005.
31. MCPHERRON A., LAWER A., LEE S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, 386:83-90, 1997.
32. MUNTONI F., BROWN s., SEWRY C., PATELK. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuromuscul Disord**, 12:438-46, 2002.
33. OWINO V., YANG S.Y., GOLDSPINK G. Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. **FEBS lett.** 505: 259-263, 2001.
34. PETERS D., BARASH I.A., BURDI M., YUAN P.S., MATHEW L., FRIDÉN J., et al. Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. **J Physiol**, 553:947-957, 2003.
35. PSILANDER N., DAMSGAARD R., PILEGAARD H. Resistance exercise alters MRF and IGF-1 mRNA content in human skeletal muscle. **J Appl Physiol**, 95:1038-1044, 2003.
36. REHNMARK S., BIANCO A.C., KIEFFER J.D., SILVA J.E. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms in uncoupling protein mRNA response to cold. **Am J Physiol**, 262:E58-67, 1992.

37. ROTH S., MARTEL G., FERREL R., METTER E., HURLEY B., ROGERS M. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. **Exp Biol Med**, 228:706-709, 2003.
38. SABORIN L.A., RUDNICK M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin Genet**, 57:16-25, 2000.
39. STAUBER W.T., MILLER G.R., GRIMMETT J.G., KNACK K.K. Adaptation of rat soleus muscles to 4 wk of intermittent strain. **J Appl Physiol**, 77:58-62, 1994.
40. STITT T.N., DRUJAN D., CLARKE B.A., PANARO F., TIMOFEYVA Y., KLINE W.O., et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents short article expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Mol Cell**, 14:395-403, 2004.
41. TINTIGNAC L.A., LAGIRAND J., BATONNET S., SIRRI V., LEIBOVITCH M.P., LEIBOVITCH S.A. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, 280:2847-2856, 2005.
42. WEHLING M., CAI B., TIDBALL J.G. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. **Faseb J**, 14:103-110, 2000.
43. WHITTEMORE L.A., SONG K., LI X., AGHAJANIAN J., DAVIES M.V., GIRGENRATH S., HILL J.J., et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochem Biophys Res Commun**, 300:965-971, 2002.
44. WILLIAMS P.E. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. **Ann Rheum Dis**, 47: 1014-1016, 1988.
45. WILLOUGHBY D.S. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. **Med Sci Sports Exerc**, 36:574-582, 2004.
46. ZADOR E., DUX L., WUYTACK F. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors

distributed along the entire length of the fibers. **J Muscle Res Cell Motil**, 20:395-402, 1999.

MANUSCRITO II

Artigo submetido à revista *International Journal of Sports Medicine*

A MMP-2 NÃO É ALTERADA PELO ALONGAMENTO INTERMITENTE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Autores:

Sabrina Messa Peviani, MS (1), Anna Raquel Silveira Gomes (2), PhD, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, PhD (3) e Tania Fátima Salvini, PhD (1).

1-Unidade de Plasticidade Muscular, Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

2-Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal do Paraná, Caiobá-Matinho, PR.

3-Unidade de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

Agradecimentos

Este projeto recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, SP, Brasil (FAPESP; processo nº 03/10889-3). Sabrina Peviani Messa é bolsista FAPESP (processo nº 05/55773-8).

Correspondente: Tania F. Salvini. Tel.: (0055-16) 3351-8345 / Fax: (0055-16) 3351-2081. Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil.

E-mail: tania@power.ufscar.br

Título-resumido: MMP-2 e curtas sessões de alongamento

Palavras-chave: alongamento, adaptação muscular, MMP-2, MMP-9, reabilitação.

RESUMO

Considerando que curtas sessões de alongamento, como recomendadas em humanos, induzem adaptação do tecido muscular e conjuntivo, a hipótese deste estudo foi que atividade das MMPs seria modulada por este estímulo. Assim, os níveis de RNAm e de atividade das MMPS foram avaliados após o alongamento do músculo sóleo de rato. Foram utilizados 50 ratos Wistar (300g) que tiveram a articulação tibio-társica da pata posterior esquerda posicionada de forma passiva e manual em flexão dorsal máxima para o alongamento do músculo sóleo. Cada sessão consistiu de 10 alongamentos de 1 min de duração e 30s de repouso entre cada repetição. Cinco grupos de animais foram submetidos a uma única sessão de alongamento e avaliados imediatamente após (I, n=5), 8h (n=5), 24h (n=5) 48h (n=5), 72h (n=5) e 168h (n=5) após a sessão de alongamento. Outros três grupos foram avaliados após 2, 3 e 7 sessões diárias de alongamento (n=5), sendo uma sessão realizada por dia. Um grupo controle (n=5) também foi analisado. Os músculos sóleos esquerdo de todos os animais, foram retirados para avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 por meio da técnica de zimografia e para avaliação dos níveis de RNAm da MMP-2, por meio da técnica de PCR (reação em cadeia polimerase) em tempo real. Uma única sessão ou várias sessões de alongamento não alteraram a atividade e a expressão gênica da MMP-2 em relação ao grupo controle. A Atividade da MMP-9 não foi detectada. Em conclusão, apesar de trabalhos prévios do nosso laboratório mostrarem que curtos períodos de alongamento induzem remodelamento da fibra muscular e do tecido conjuntivo, os resultados do presente estudo indicaram que a MMP-2 e MMP-9 não estão envolvidas neste processo.

Introdução

O músculo esquelético tem a propriedade de se adaptar a diferentes estímulos que dependem das mudanças na demanda muscular resultando em modificações moleculares, estruturais e funcionais, também conhecido como plasticidade muscular.

Tanto os estímulos hipertróficos como os atroficos envolvidos no remodelamento muscular levam a reorganização das fibras e da matriz extracelular (MEC). A MEC é constituída por proteínas organizadas e estruturadas que fornecem força, suporte e proteção para as fibras musculares e desempenham uma importante função na transmissão da força e elasticidade para os tecidos (KOSKINEN et al., 2002; CARMELI et al., 2005). Os principais componentes da MEC do músculo esquelético são os colágenos fibrilares do tipo I e III enquanto que o colágeno não fibrilar do tipo IV, está localizado na membrana basal (KOSKINEN et al., 2002).

Para a ocorrência do remodelamento da MEC são necessários vários eventos que conduzem à degradação proteolítica dos componentes extracelulares, nos quais as metaloproteases de matriz (MMPs) possuem um papel fundamental (STAMENKOVIC, 2000; PAGE-MC CAW et al., 2007). A família das MMPs são compostas por mais de 20 membros subdivididos em colagenases, estromelisinases, gelatinases e MMP do tipo membrana (STAMENKOVIC, 2000). Estas proteases extracelulares são Ca^{2+} e Zn^{2+} dependentes, secretadas na forma de pro-enzimas, necessitando da sua ativação para desempenhar sua atividade proteolítica, sendo sua inibição decorrente da atividade de inibidores teciduais de matriz extracelular, os TIMPs (NAGASE e WOESSNER, 1999).

A atividade das MMPs devem ser precisamente reguladas devido ao seu potente efeito tecidual, uma vez que a quebra desse balanço está estritamente relacionado aos processos patológicos. Desse modo, suas atividades são reguladas em diferentes níveis:

transcricional, ativação proteolítica e a inibição da enzima ativa (STAMENKOVIC, 2000; PAGE-MC CAW et al., 2007). A degradação proteolítica dos componentes da MEC pode resultar em diferentes efeitos (revisado por PAGE-MC CAW et al., 2007) tais como: aumento do espaço extracelular para permitir a migração celular, liberação de moléculas sinalizadoras [como: fator transformante de crescimento (TGF- β), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros], degradação de junções intercelulares ou da membrana basal como, por exemplo, no crescimento dos vasos sanguíneos (revisado por BROWN & HUDLICKA, 2003), na regeneração (KHERIF et al., 1999; KOSKINEN et al., 2002) e no processo de remodelamento (KOSKINEN et al., 2001).

Nas últimas décadas, o maior interesse sobre as funções das MMPs estava relacionado as suas funções nos processos patológicos como na artrite reumatóide, metástase e câncer (STAMENKOVIC, 2000; CHANG e WERB, 2001). No entanto é interessante notar o envolvimento dessas proteases nos processos fisiológicos envolvendo mudanças na demanda, como a que ocorre no exercício físico (KOSKINEN et al., 2001, 2002; CARMELI et al., 2005), imobilização (AHTIKOSKI et al., 2003), regeneração (KHERIF et al., 1999; KOSKINEN et al., 2002) e desnervação (DEMESTRE et al., 2005). Porém, existem poucas informações sobre a atividade das MMPs no músculo esquelético submetido ao alongamento.

As MMP-2 e 9 (gelatinases A e B, respectivamente) são as principais metaloproteases envolvidas no remodelamento do músculo esquelético tanto com as mudanças da demanda como em resposta a lesão (CARMELI et al., 2004). Sob condições basais, o músculo produz constitutivamente a MMP-2 (KHERIF et al., 1999). Por outro lado, a MMP-9 é tipicamente ausente na MEC do músculo normal, sendo ativada somente nos músculos lesados (KHERIF et al., 1999).

Esta bem descrito na literatura que o alongamento muscular é um potente sinal mecânico que induz a síntese protéica e o crescimento muscular (GOLDSPINK, 1992; GOLDSPINK et al., 2002; COUTINHO et al., 2004, 2006). Em humanos, o alongamento é amplamente usado na reabilitação e nas atividades esportivas para ganho de amplitude de movimento e flexibilidade. Os modelos animais para examinar os efeitos do alongamento na plasticidade muscular comumente usam esse estímulo de forma passiva e crônica (dias ou semanas) por meio de imobilização usando gesso (ANSVED, 1995; HARJOLA et al., 2000) ou fita adesiva (WILLIAMS, 1988; GOMES et al., 2006). Por outro lado, curtos períodos de alongamento passivo (30 segundos a 1 minuto) têm sido recomendados para reduzir o encurtamento muscular em humanos devido a sua efetividade no ganho da amplitude de movimento e flexibilidade (BANDY & IRON, 1994; BANDY et al., 1997).

Considerando estudos prévios do nosso laboratório em que curtos períodos de alongamento induziram adaptação muscular, alteração da expressão gênica (GOMES et al., 2004, 2006; PEVIANI et al., 2007) e foram também efetivos no remodelamento do tecido conjuntivo após imobilização (COUTINHO et al., 2006), a hipótese desse estudo foi que a atividade das MMPs também se alteraria com curtos períodos de alongamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho Experimental

Foram utilizados 50 ratos Wistar, com peso corporal médio de 300 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, e mantidos em biotério próprio do Departamento de Fisioterapia. Eles foram isolados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada. O projeto foi conduzido segundo as normas para experimentação animal definidas pelo Comitê de Ética Animal da UFSCar.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 10 grupos de cinco animais cada. Eles foram anestesiados com intraperitoneal injeções de xilazina (12 mg.kg⁻¹) e cetamina (95 mg.kg⁻¹) para o procedimento de alongamento e retirada dos músculos. Eles foram então eutanasiados com uma overdose anestésica.

Cada sessão consistiu de 10 de alongamentos, com 1 min de duração cada um, e 30s de repouso entre cada repetição. Os animais tiveram a articulação tibio-társica esquerda posicionada de forma passiva e manual em flexão dorsal máxima para o alongamento do músculo sóleo. Cinco grupos de animais foram submetidos a uma única sessão de alongamento e avaliados imediatamente após (I, n=5), 8h (n=5), 24h (n=5) 48h (n=5), 72h (n=5) e 168h (n=5). Para avaliar o efeito de sessões repetitivas de alongamento no músculo sóleo ao longo de uma semana, três grupos de animais receberam uma única sessão de alongamento e foram avaliados imediatamente após 2, 3 e 7 sessões (n=5), ou seja, o grupo “2 sessões” foi alongamento diariamente por dois dias consecutivos; o grupo “3 sessões” foi alongamento diariamente por três dias consecutivos e o grupo “7 sessões” foi alongamento diariamente por 7 dias consecutivos. Um grupo controle

(n=5), não submetido a nenhum procedimento também foi analisado.

O músculo sóleo foi escolhido por ser uniarticular e por apresentar suas fibras distribuídas de tendão a tendão. Além disso, o músculo sóleo tem sido amplamente utilizado em prévios estudos investigando o efeito do alongamento no músculo esquelético (COUTINHO et al., 2004, 2006; GOMES et al., 2004, 2006, PEVIANI et al., 2007).

Os animais, de todos os grupos, tiveram o músculo sóleo da pata esquerda removidos, pesados, e cortados em quatro partes iguais no sentido transversal, congelado em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . As partes distais de cada músculo congelado foram utilizadas avaliação da expressão gênica, enquanto as porções mediais foram utilizadas para análise de zimografia.

Alongamento muscular

Para se efetuar o alongamento passivo no músculo sóleo esquerdo, os animais foram previamente anestesiados com cetamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) intra peritoneal. Em seguida, os animais foram pesados. Cada sessão de alongamento consistiu em 10 alongamentos de 1 minuto, seguido por 30 segundos de intervalo entre eles, onde a articulação tibio-társica foi colocada em flexão dorsal máxima para alongamento do sóleo e mantida manualmente nessa posição como descrito previamente por PEVIANI et al. (2007).

Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante. Esse método é baseado no ácido bicinchonínico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais.

As absorvâncias da curva padrão e das amostras de interesse foram lidas a 562 nm e a concentração protéica estimada a partir delas.

Zimografia

A metodologia empregada foi adaptada de MARQUETI et al. (2006). O tecido congelado foi lavado 3 a 4 vezes com solução salina gelada e incubado com o tampão de extração (10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0; 150mM de NaCl; 1 μ M de ZnCl₂; 20mM de CaCl₂; 1,5mM de NaN₃ e 0,01% de Triton X-100) à 4°C, com agitação contínua, durante 24 horas. Após este tempo, o tampão de extração foi coletado por centrifugação. Iguais quantidades de proteína total (30 μ g / poço) compostas por um pool de 5 músculos sóleos por grupo (6 μ g per animal) foram submetidas a eletroforese em quadruplicata.

Os géis de zimografia consistiram de géis de poliacrilamida (10%) com gelatina (100mg/ml) na presença de SDS sob condições não reduzidas. A eletroforese (100 V) foi realizada até o corante atingir a base do gel. Após a eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes durante 30 minutos em solução 2,5 % de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de substrato (50mM de Tris-HCl, pH 8,5; 5mM de CaCl₂ e 0,02% NaN₃) à 37° C, durante 24 horas. Após este tempo, o gel foi corado com Coomassie Blue por 30 minutos e descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade. As bandas de atividade foram visualizadas como bandas claras contra o fundo azul, indicando a proteólise do substrato. As amostras também foram testadas na presença de 15mM EDTA. A massa molecular das bandas de atividades gelatinolítica foi determinada por comparação com marcador de massa molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON).

Análise Densitométrica

A análise densitométrica quantitativa das bandas que compõem a MMP-2 foi realizada utilizando o software Gene Tools versão 3,06 (Syngene, Cambridge, UK).

Extração de RNA total

A extração de RNA total de cada animal foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão ≥ 1.8). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras (1,5 μ g de RNA total) em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico).

RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)

A reação da transcrição reversa (RT) contendo 1 μ g de RNA total, 1 μ l de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5 μ l) foi incubada à 70°C por 10 min e então resfriada rapidamente em gelo. Adicionou-se a cada amostra uma mistura contendo: 1 μ l de dNTPmix (deoxynucleotide triphosphate) contendo 0.2 mmol·L⁻¹ de cada dNTP (ATP, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2 μ l de DTT 0.1 mol·L⁻¹, 4 μ l de tampão 5x e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min.

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida através da realização de gel de agarose (1%) não desnaturante, corado com brometo de etídeo.

Real Time-PCR

As reações em cadeia polimerase (PCR) foram realizadas em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Rotor Gene 3000). As reações foram efetuadas utilizando-se 40ng/μl de cDNA, para todos os genes avaliados, adicionado a uma reação contendo 25μl de SYBR® Green PCR master mix, e 180nM do primer, em uma solução com volume final de 55μl, dividido em dois tubos (duplicata). As condições de ciclagem consistiram para MMP-2 e GAPDH de 10 min à 95°C, e então 40 ciclos de 15s à 94°C, 30s à 48°C para MMP-2 e à 56°C para GAPDH, respectivamente, e 1 min à 72°C, e então 10 min à 72°C. Para cada gene, todas as amostras foram amplificadas simultaneamente e em duplicatas. Os dados foram analisados usando o método comparativo do ciclo limiar (Ct). A expressão do gene alvo foi normalizada para o gene GAPDH. Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo RNA, mas não M-MLV RT, para garantir que o produto do PCR não estava amplificando DNA genômico (SCHWARTZ et al., 2005).

Primers

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como primers foram desenhados para GAPDH (controle endógeno) no programa Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA), enquanto que a seqüência do primer da MMP-2 foi descrita por MENON et al. (2005). As seqüências usadas foram MMP-2 (forward: CTGATAACCTGGATGCAGTCGT; reverse: CCAGCCAGTCCGATTTGA) e GAPDH (forward: CCACCAACTGCTTAGCCC; reverse: GCCAAATTCGTTGTCATACC), ambos de rato.

Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade, seguido por ANOVA e teste post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Detecção da atividade das MMPs

Os géis de zimografia (Figuras 1 e 2) mostraram a atividade da MMP-2 como três bandas bem definidas (72 kDa / pro-MMP-2; 64 kDa / intermediária-MMP-2; e 57 kDa /ativa-MMP-2) em todos os grupos, como descrito por CARVALHO et al. (2006). Esta atividade foi completamente abolida quando os géis foram incubados em substrato contendo 15mM EDTA. A densitometria das bandas mostrou que tanto uma única sessão (Figura 1) como várias sessões de alongamento (Figura 2) não alteraram a atividade da MMP-2 em relação ao grupo controle. A Atividade da MMP-9 não foi detectada.

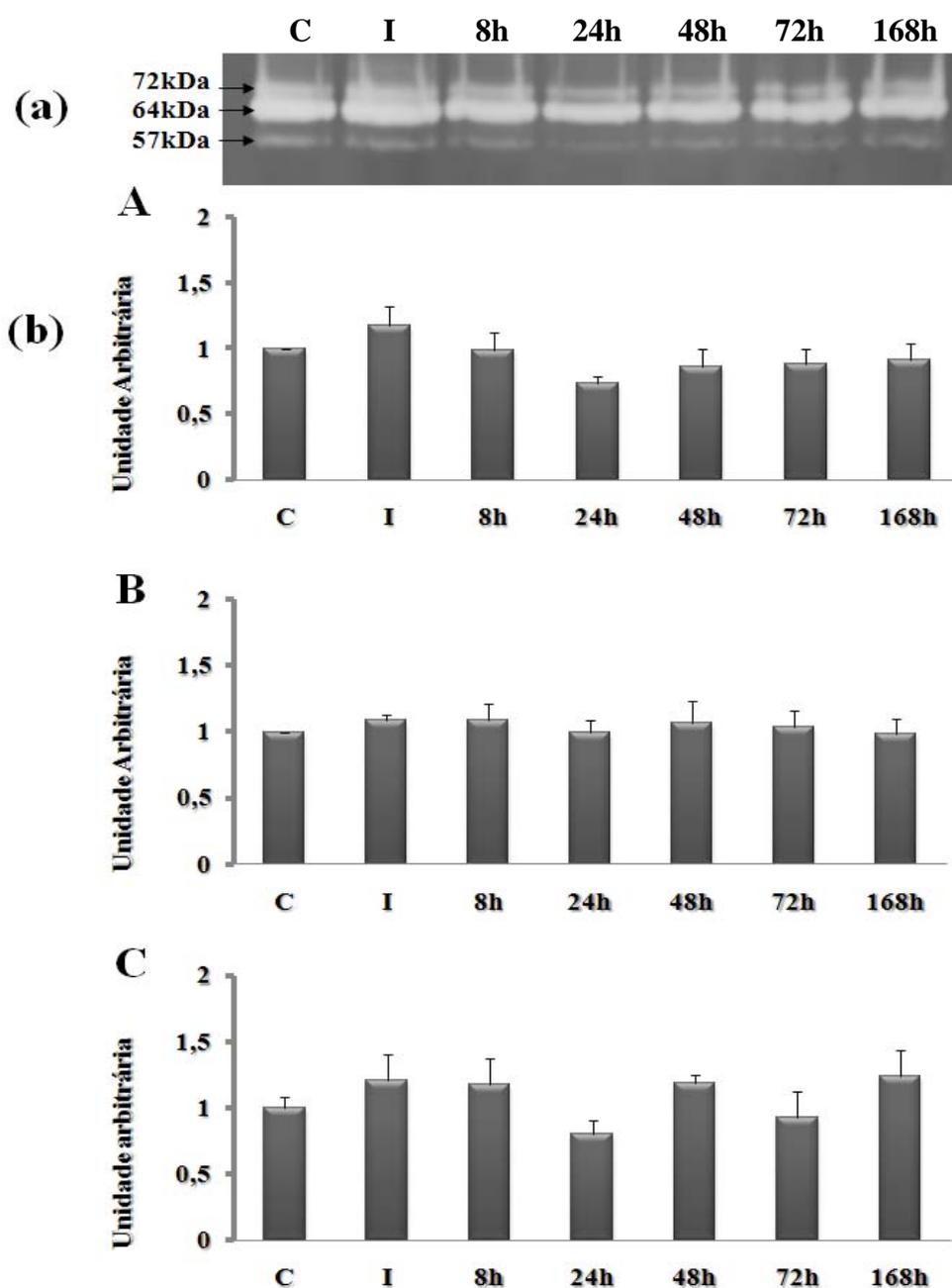


Figura 1- Densitometria da zimografia das bandas da MMP-2 em unidades arbitrarias: (a) gel de zimografia dos músculos sóleos após uma única sessão de alongamento, e (b) análise densitométrica em unidades arbitrarias das bandas (A) pró- (72 kDa), (B) intermediária- (64 kDa) e (C) MMP2 ativa (57 kDa). C: grupo controle; I: imediatamente após, 8h, 24h, 48h, 72h e 168 horas após uma única sessão de alongamento. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

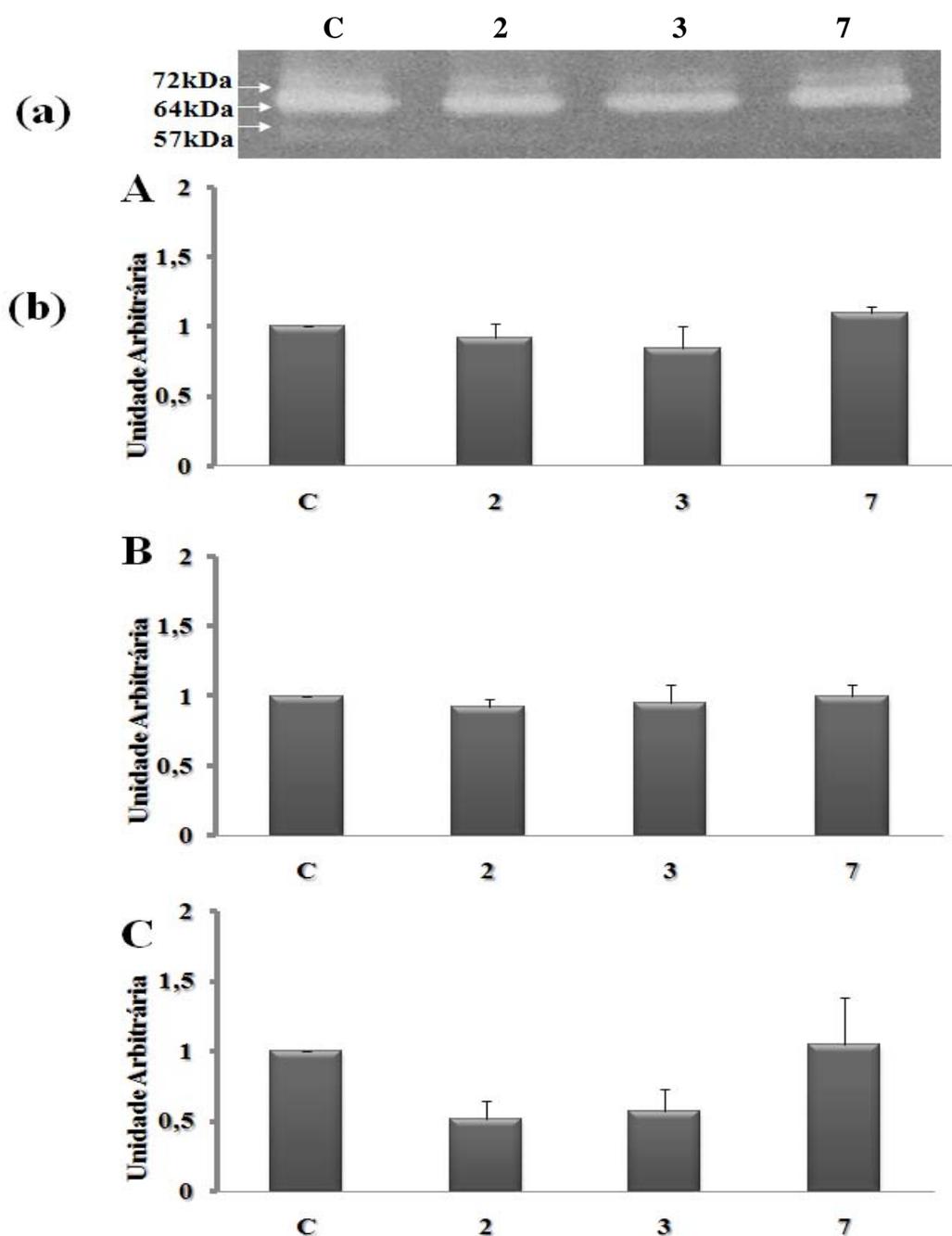


Figura 2- Densitometria da zimografia das bandas da MMP-2 em unidades arbitrárias: (a) gel de zimografia dos músculos soleus após várias sessões de alongamento, e (b) análise densitométrica em unidades arbitrárias das bandas (A) pró- (72 kDa), (B) intermediária- (64 kDa) e (C) MMP2 ativa (57 kDa). C: grupo controle; 2, 3 e 7 sessões de alongamento. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Expressão Gênica

Considerando que a atividade da MMP-9 não foi detectada em nenhum dos grupos, foi avaliada a expressão gênica somente da MMP-2. Novamente, uma única sessão (**Figura 3a**) e várias sessões de alongamento (**Figura 3b**) não alteraram a expressão gênica da MMP-2 em relação ao grupo controle.

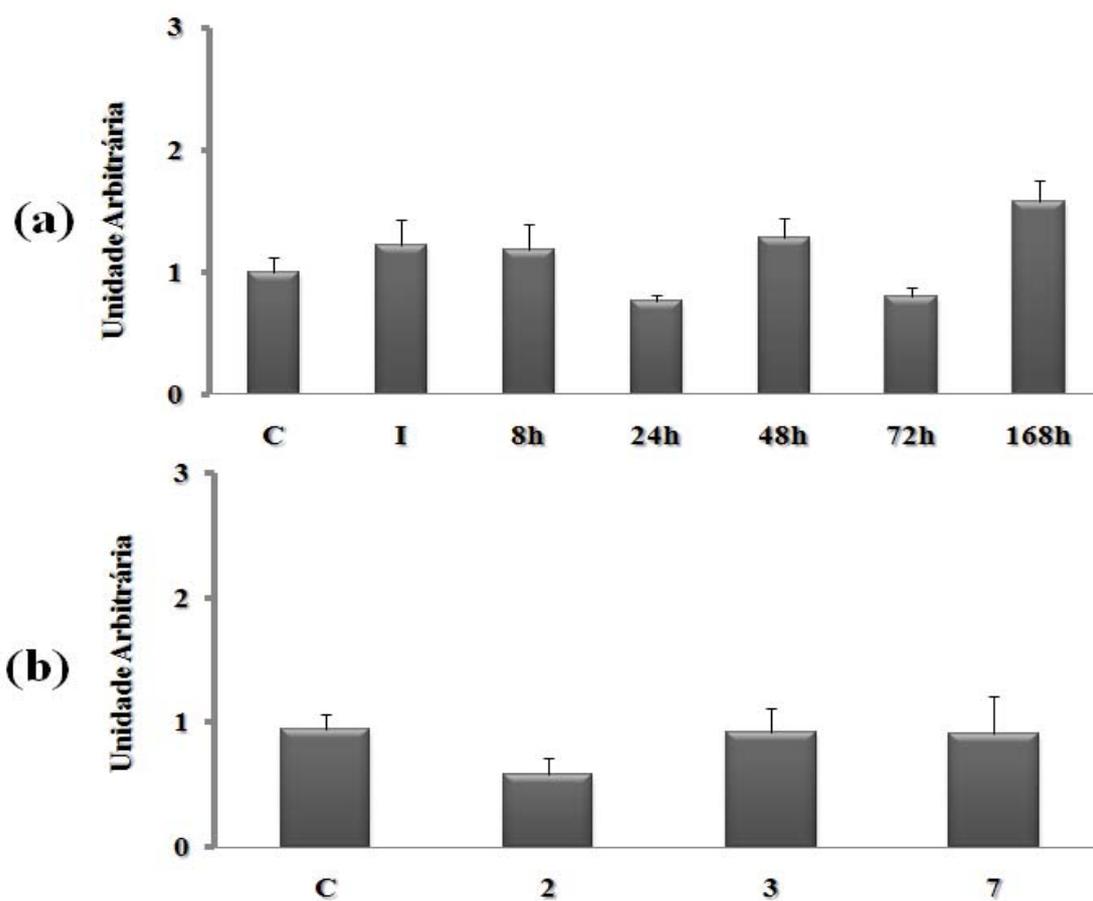


Figura 3- Níveis de RNAm da MMP-2 no músculo soleus de rato. (a): avaliados após uma única sessão. (b): avaliado após várias sessões. C: grupo controle; 2, 3 e 7 sessões de alongamento. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que curtos períodos de alongamento muscular não alteraram a atividade e a expressão gênica da MMP-2, bem como a atividade da MMP-9 tanto após uma única sessão, como após várias sessões de alongamento, sugerindo que este estímulo não foi capaz de alterar essas MMPs. Por outro lado, este mesmo modelo de alongamento alterou três genes músculo-específicos relacionados à hipertrofia e atrofia muscular (PEVIANI et al., 2007), e também induziu a reorganização das bandas de colágeno medidas por birrefringência após imobilização (COUTINHO et al., 2006). Existem poucos estudos na literatura a respeito dos efeitos do alongamento na atividade das MMPs no músculo esquelético.

Alguns estudos mostram que alterações na demanda muscular tanto por estímulo hipertrófico como atrófico alteram a resposta das MMPs. AHTIKOSKI et al. (2003) mostraram um aumento tanto na atividade como no RNAm da MMP-2 nos músculos sóleos, gastrocnêmio e extensor digital longo após imobilização em posição de alongamento e encurtamento por 1, 3 e 7 dias, mas não na atividade da MMP-9. O presente estudo também não encontrou presença na atividade da MMP-9, corroborando os achados de AHTIKOSKI et al. (2003). Em contraste, o presente estudo não observou alteração na expressão e na atividade da MMP-2 após curtos períodos de alongamento. AHTIKOSKI et al. (2003) usaram o modelo de imobilização para manter o músculo sob constante tensão mecânica por longos períodos de tempo (dias), enquanto o presente estudo utilizou curtos períodos de tensão (10 alongamentos de 1 min cada). A comparação entre estes estudos sugere que o tempo de duração do alongamento é

importante na regulação das MMPs no músculo esquelético. Possivelmente, o período de tempo do alongamento foi responsável pelos resultados distintos.

A ativação das MMP-2 e -9 também está envolvida na regeneração muscular. KHERIF et al. (1999) associaram a expressão diferencial da MMP-2 e MMP-9 no músculo tibial anterior (TA) com o período de regeneração muscular. A atividade da MMP-2, que é expressa constitutivamente no TA normal, está relacionada com a regeneração das novas miofibrilas provavelmente para degradar o colágeno tipo IV da membrana basal durante a proliferação, migração e fusão dos mioblastos. Por outro lado, a ativação da MMP-9 está relacionada à fase inflamatória aguda e provavelmente à ativação das células satélites. KOSKINEN et al. (2002) também correlacionaram o padrão diferencial da MMP-2 e -9 com os diferentes estágios do processo de regeneração no TA após exercício excêntrico, sugerindo que a atividade da MMP-9 depende da severidade da lesão muscular. A não detecção da atividade da MMP-9 no presente estudo corrobora com os achados prévios de nenhum sinal de lesão muscular, observado nas análises histoquímicas, utilizando o mesmo modelo de alongamento no músculo sóleo de rato (PEVIANI et al., 2007).

No exercício físico, KOSKINEN et al. (2001) mostraram alterações nos níveis de RNAm e proteína tanto do colágeno tipo IV como da MMP-2 após lesão induzida por corrida em esteira nos músculos sóleo e quadríceps femoral de ratos, mas não na MMP-9, sugerindo que o aumento da MMP-2 também depende da severidade da lesão e, dessa forma, provavelmente refletindo a reorganização da membrana basal. Por outro lado, CARMELI et al. (2005), demonstraram que o aumento dos níveis de RNAm da MMP-2 e da sua proteína aumentaram apenas após exercício de alta intensidade e somente nos músculos com alta percentagem de fibras rápidas, sugerindo que a MMP-2 depende da intensidade do exercício e do tipo de fibra muscular. Desse modo, é possível

que no presente estudo os níveis de MMP-2 não se alteram devido a análise do músculo sóleos que contem alta percentagem de fibras lentas (88%) (GOMES et al., 2007), e provavelmente por causa dos curtos períodos de tensão muscular induzido pelo modelo de alongamento utilizado no presente estudo.

Em conclusão, apesar de trabalhos prévios do nosso laboratório mostrarem que curtos períodos de alongamento induzem o remodelamento da fibra muscular e do tecido conjuntivo, os resultados do presente estudo indicaram que a MMP-2 e MMP-9 não estão envolvidas neste processo. Considerando que o protocolo é efetivo para o ganho e na manutenção da flexibilidade em humanos, o presente estudo traz novas informações sobre a adaptação muscular ao remodelamento induzido pelo alongamento.

REFERÊNCIAS

1. AHTIKOSKI A.M.; KOSKINEN S.O.; VIRTANEN P.; KOVANEN V.; RISTELI J.; TAKALA T.E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 177: 473-481, 2003.
2. ANSVED T. Effects of immobilization on the rat soleus muscle in relation to age. **Acta Physiol Scand**, 154: 291-302, 1995.
3. BANDY W.D.; IRION J.M.; BRIGGLER M. The effect of time and frequency of static stretching on flexibility of the hamstring muscles. **Phys Ther**, 77: 1090-1096, 1997.
4. BANDY W.D.; IRION J.M. The effects of time on static stretch on the flexibility of the hamstring muscle. **Phys Ther**, 74: 845-852, 1994.
5. BROWN M.D.; HUDLICKA O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. **Angiogenesis**, 6: 1-14, 2003.
6. CARMELI E.; MOAS M.; LENNON S.; POWERS S.K. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. **Exp Physiol**, 90: 613-619, 2005.
7. CARMELI E.; MOAS M.; REZNICK A.Z.; COLEMAN R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, 29: 191-197, 2004.
8. CARVALHO R.F.; DARIOLLI R.; JUSTULIN JR. L.A.; SUGIZAKI M.M.; OKOSHI M.P.; CICOGNA A.C.; FELISBINO S.L.; SILVA M.D.P. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. **Int J Exp Path**, 87: 437-443, 2006.

9. CHANG C.; WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, 11: 37-43, 2001.
10. COUTINHO E.L.; GOMES A.R.; FRANCA C.N.; OISHI J.; SALVINI T.F. Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**, 37: 1853-1861, 2004.
11. COUTINHO E.L.; DELUCA C.; SALVINI T.F.; VIDAL B.C. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. **Connect Tissue Res**, 47: 278-286, 2006.
12. DEMESTRE M., ORTH M., WELLS G.M., GEARING A.J., HUGHES R.A.C., GREGSON N.A. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 31: 545-555, 2005.
13. GOLDSPIK G., SCUTT A., LOUGHNA P.T., WELLS D.J., JAENCKE T., GERLACH G.F. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. **Am J Physiol**, 22: 356-363, 1992.
14. GOLDSPIK G., WILLIAMS P., SIMPSON H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop Relat Res**, 1: 146-152, 2002.
15. GOMES A.R., CORNACHIONE A., SALVINI T.F., MATTIELLO-SVERZUT A.C.. Morphological effects of two protocols of passive stretch over the immobilized rat soleus muscle. **J Anat**, 210: 328-335, 2007.
16. GOMES A.R.S., COUTINHO E.L., FRANÇA C.N., POLONIO J., SALVINI T.F. The effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. **Braz J Med Biol Res**, 37:1473-1480, 2004.
17. GOMES A.R.S., SOARES A.G., PEVIANI S.M., NASCIMENTO R.B., MORISCOT A.S., SALVINI T.F. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat

- soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil**, 87: 241-246, 2006.
18. HARJOLA V.P., JANKALA H., HARKONEN M. Myosin heavy chain mRNA and protein distribution in immobilized rat skeletal muscle are not affected by testosterone status. **Acta Physiol Scand**, 169: 277-282, 2000.
19. KHERIF S., LAFUMA C., DEHAUPAS M., LACHKAR S., FOURNIER J.G., VERDIERE-SAHUQUE M., FARDEAU M., ALAMEDDINE H.S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Dev Biol**, 205: 158-170, 1999.
20. KOSKINEN S.O., AHTIKOSKI A.M., KOMULAINEN J., HESSELINK M.K., DROST M.R., TAKALA T.E. Short-term effects of forced eccentric contractions on collagen synthesis and degradation in rat skeletal muscle. **Pflugers Arch**, 444: 59-72, 2002.
21. KOSKINEN S.O., WANG W., AHTIKOSKI A.M., KJAER M., HAN X.Y., KOMULAINEN J., KOVANEN V., TAKALA T.E. Acute exercise induced changes in rat skeletal muscle mRNAs and proteins regulating type IV collagen content. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 280: 1292-1300, 2001.
22. MENON B., SINGH M., SINGH K. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 289: 168-176, 2005.
23. NAGASE H., WOESSNER J.F.Jr. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, 274: 21491-21494, 1999.
24. PAGE-MCCAW A., EWALD A.J., WERB Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8: 221-233, 2007.

25. PEVIANI S.M.; GOMES A.R.S.; MOREIRA R.F.C.; MORISCOT A.S.; SALVINI T.F. Short bouts of stretching increase Myo-D, Myostatin and Atrogin-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, 35: 363-370, 2007.
26. RUSSO T.L.; PEVIANI S.M.; DURIGAN J.L.Q.; SALVINI T.F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, 37: 593-600, 2008.
27. SCHWARTZ, P.H.; NETHERCOTT, H.; KIROV, I.I.; ZIAEIAN, B.; YOUNG, M.J.; KLASSEN, H. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. **Stem Cells**, 23: 1286-1294, 2005.
28. STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, 10: 415-433, 2000.
29. WILLIAMS P.E. Effect of intermittent stretch on immobilized muscle. **Ann Rheum Dis**, 47: 1014-1016, 1988.

MANUSCRITO III

Artigo submetido à Revista Neurorehabilitation and Neural Repair

O ALONGAMENTO E A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA REGULAM A METALOPROTEINASE-2 NO MÚSCULO DESNERVADO DE RATO

Autores:

Sabrina Messa Peviani, PhD, Thiago Luiz Russo, PhD, João Luiz Quagliotti Durigan, MS, PhD, Beatriz Santos Vieira, Clara Maria Pinheiro, Marcela Salvador Galassi, and Tania Fátima Salvini, MS, PhD.

Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 05/5474-3) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). SM Peviani, TL Russo, BS Vieira, e CM Pinheiro foram bolsistas FAPESP; JL Durigan e MS Galassi do CNPq. Os autores são gratos à TFF Piassi pelo suporte técnico e a Anna Krylova pela revisão do Inglês.

Autor correspondente: Tania de Fatima Salvini. Fone: 55-16-33518345 / FAX: 55-16-33512081. E-mail: tania@ufscar.br

Título resumido: Alongamento, estimulação elétrica e MMP-2.

RESUMO

O músculo desnervado sofre atrofia muscular, degeneração, perda de força e aumento da proliferação do tecido conjuntivo, prejudicando as atividades funcionais. A estimulação elétrica (EE) e o alongamento (Al) são comumente utilizados na reabilitação de músculos desnervados em humanos. No entanto, seus efeitos, especialmente sobre a matriz extracelular (MEC), permanecem indeterminados. O remodelamento da MEC no músculo esquelético envolve inúmeros eventos que levam a degradação proteolítica dos seus componentes, nos quais as metaloproteinases de matriz (MMPs) têm um papel crítico. A proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da EE, do alongamento e de sua associação sobre a expressão gênica e a atividade da MMP-2 durante a fase inicial da desnervação do músculo tibial anterior (TA) de rato por axoniotmese, bem como sobre sua área de secção transversa. Trinta animais foram divididos em cinco grupos: (1) normal (N); (2) desnervado (D); (3) desnervado submetido à sessões diárias de EE (D+EE); (4) desnervado submetidos à sessões diárias de alongamento (D+Al); (5) desnervado submetidos diariamente à EE e ao alongamento (D+EE+Al). As técnicas de zimografia e a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram utilizadas para avaliar a atividade e a expressão gênica da MMP-2, respectivamente. O alongamento aumentou a atividade da MMP-2 no músculo desnervado quando realizado isolado ou em associação com a EE, quando comparado com os grupos N, D, D+EE ($p < 0,01$). O alongamento, a EE, bem como sua associação aumentaram a expressão gênica da MMP-2 no músculo desnervado quando comparados aos grupos N e D ($p < 0,05$). Nenhuma das intervenções (EE, Al ou EE+Al) reduziu a atrofia da fibra muscular após a desnervação. Dessa forma, o alongamento é o principal estímulo que leva a ativação da MMP-2, enquanto a EE e o alongamento são capazes de aumentar a expressão gênica da MMP-2 no músculo desnervado de rato, sugerindo o remodelamento da MEC.

Palavras-chave: músculo esquelético, lesão nervosa, reabilitação, MMP-2, axoniotmese, fisioterapia.

ABREVIATURAS

AST: área de secção transversa

MEC: matriz extracelular

EE: estimulação elétrica

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

MMP-2: metaloproteinase de matriz 2

MMP-9: metaloproteinase de matriz 9

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

PCR: reação em cadeia da polimerase

Al: Alongamento

TB: Azul de Toluidina/1% borax

INTRODUÇÃO

A atrofia muscular é um dos problemas mais importantes na reabilitação de indivíduos com lesões do nervo periférico. Normalmente, esta atrofia está associada à perda de força muscular e limitação funcional. Em geral, a reabilitação muscular é incompleta (KOUYOUUMDJIAN, 2006).

Além da atrofia muscular, a desnervação provoca uma série de alterações fisiológicas e moleculares que envolvem alterações na excitabilidade da fibra muscular (ASHLEY et al., 2005; RUSSO et al., 2004, 2007; SALMONS et al., 2005) e aumento da expressão de genes da atrofia (BODINE et al., 2001, RUSSO et al., 2007). Além disso, a atrofia mediada pela desnervação é marcadamente acompanhada por fibrose e aumento da densidade do tecido conjuntivo nos espaços extracelulares (KUMAR et al., 2006; RUSSO et al., 2008) que aumentam a rigidez e diminuem a extensibilidade muscular prejudicando a capacidade do músculo de transmitir força (ARRUDA et al., 2007).

As alterações na matriz extracelular (MEC) em torno da fibra muscular requerem a ação de enzimas proteolíticas que desempenham um papel crítico na sua reorganização, conhecidas por metaloproteinases de matriz (MMPs) (DEMESTRE et al., 2005; KHERIF et al., 1998).

As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas, presentes no músculo esquelético na junção neuromuscular (JNM) e ao redor das fibras musculares, que podem degradar os componentes da MEC incluindo laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e tenascina (DEMESTRE et al., 2005). Elas são secretadas no músculo esquelético pelas células de Schwann (YAMADA et al., 1995), axônios (MUIR, 1994; NORDSTROM et al., 1995), células satélites (GUERIN e HOLLAND, 1995), e fibroblastos (SCOTT et al., 1998).

A função das MMPs no músculo desnervado ainda não está totalmente compreendida. No músculo normal, as MMP-2 e MMP-9 estão localizadas na JNM, células de Schwann e no perineuro dos nervos intramusculares (KHERIF et al., 1998). No entanto, após compressão nervosa, ambas MMPs permanecem presentes na JNM, mas sem importante alteração na sua atividade. Por outro lado, no nervo, ocorre uma diminuição da atividade da MMP-2 e um aumento da atividade da MMP-9 (KHERIF et al., 1998).

Na tentativa de recuperação do músculo desnervado, duas estratégias terapêuticas não-invasivas têm sido comumente utilizadas na reabilitação em humanos: a estimulação elétrica (EE) e o alongamento (Al). Recentes estudos em animais mostraram que 200 contrações induzidas eletricamente por eletrodos implantados podem impedir a atrofia da fibra muscular no músculo desnervado de rato (DOW et al., 2004; KOSTROMINOVA et al., 2005). Outro estudo, utilizando EE por eletrodos de superfície para estimular o músculo tibial anterior (TA) desnervado de rato mostraram que poucas contrações musculares (20 contrações / todos os dias) reduziram as expressões gênicas de myoD e atrogina-1 envolvidas nas vias hipertróficas e atróficas, respectivamente (RUSSO et al., 2007).

Com relação ao alongamento muscular, está bem descrito que este estímulo é um poderoso sinal mecânico que induz à síntese protéica e o crescimento muscular (GOLDSPINK, 1999; GOLDSPINK et al., 2002). No entanto, poucos estudos avaliaram os efeitos do alongamento no músculo desnervado. LOUGHNA e MORGAN (1999) mostraram que o alongamento regula o gene da cadeia pesada da miosina (MHC) por meio da tensão gerada pelo sinal mecânico, independentemente da inervação. Além disso, SAKAKIMA e YOSHIDA (2003) observaram que o alongamento aplicado 40

min por dia, 6 vezes por semana, minimizou a atrofia apenas nas duas primeiras semanas de desnervação do músculo sóleo.

No entanto, não está totalmente esclarecido se a EE, o alongamento, bem como sua associação, poderiam afetar o remodelamento da MEC por meio das MMPs. KOSKINEN et al. (2000) reportaram que estimulação elétrica funcional (FES) crônica de músculos paralizados de sujeitos com lesão medular aumentou o colágeno tipo IV, indicando um processo de remodelamento do colágeno intramuscular via atividade da MMP-2, em resposta à EE do músculo. No entanto, ainda é incerto como a EE afeta o remodelamento da MEC do músculo após lesão nervosa. Um recente estudo no nosso laboratório mostrou que a EE (20 contrações) usando eletrodos de superfície foi capaz de modular a expressão gênica da MMP-2 do músculo desnervado do rato, mas não impediu a atrofia muscular (RUSSO et al., 2008).

Os efeitos do alongamento muscular no remodelamento da MEC por meio das MMPs são escassos na literatura. Um interessante estudo mostrou um aumento tanto no RNAm como na atividade da MMP-2 nos músculos sóleo, gastrocnêmio e extensor digital longo (EDL) de rato após imobilização em posição de alongamento e encurtado por 1, 3 e 7 dias (AHTIKOSKI et al., 2003), mas não na atividade da MMP-9. No entanto, protocolos clínicos de alongamento como recomendados na reabilitação ou na prática esportiva, ou seja, quando o músculo é mantido em alongamento apenas por poucos minutos (GOMES et al., 2006; PEVIANI et al., 2007), não foram investigados em músculos desnervados.

Tendo em vista estes aspectos, a proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da EE, do alongamento, bem como de sua associação, utilizando protocolos de intervenção similares aos usados na reabilitação em humanos, sobre a expressão gênica e atividade das MMPs no músculo tibial anterior desnervado de rato. Para avaliar possíveis efeitos

dessas intervenções na atrofia muscular, a área transversal da fibra muscular (AST) também foi avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais

Trinta ratos Wistar ($265,8 \pm 17.6\text{g}$) de três meses de idade foram utilizados. Os animais permaneceram em gaiolas plásticas com livre acesso à água e ração peletizada, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura controlada. O Comitê de Ética Animal da Universidade aprovou os procedimentos experimentais e estudo foi conduzido de acordo com o guia nacional de cuidados e utilização de animais de laboratório.

Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos: (1) normal (N, n = 6) nenhuma intervenção foi realizada e os animais foram mantidos livres na gaiola durante 7 dias; (2) músculo tibial anterior (TA) desnervado (D, n = 6); (3) músculo TA desnervado submetidos à avaliação de excitabilidade elétrica e à EE diária (D+EE, n = 6); (4) músculo TA desnervado submetido ao alongamento diário (D+Al, n = 6); (5) músculo TA desnervado submetido à avaliação de excitabilidade elétrica e à EE associado ao alongamento diário (D+EE+Al, n = 6).

O músculo TA foi escolhido uma vez que quase todas as fibras cruzam o meio do ventre do músculo e são distribuídas de tendão à tendão (LIEBER, 2004). Além disso, é um músculo superficial tornando fácil a identificação da mínima contração visível e permitindo o tratamento seletivo da EE a ser aplicada diretamente sobre a pele por meio de eletrodos de superfície.

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg / kg) e cetamina (95 mg / kg) para os processos cirúrgicos de desnervação, para a avaliação dos parâmetros elétricos e as intervenções de EE e alongamento, assim como para a remoção dos músculos. Os animais foram eutanasiados com overdose anestésica no 7^o dia do procedimento experimental. Este período de desnervação foi escolhido uma vez que a atrofia muscular é elevada durante as primeiras semanas (BODINE et al., 2001). Os músculos TA contra-laterais também foram avaliados, mas nenhuma diferença foi observada em todas as variáveis em relação ao grupo N.

Desnervação

A desnervação consistiu da axoniotmese do nervo ciático como descrita anteriormente (JUNGNICKEL et al., 2006; SEO et al., 2006). Resumidamente, uma pequena incisão foi feita na pele e na fáscia próxima ao trocânter direito entre os músculos glúteo máximo e bíceps femoral para exposição do nervo ciático. Posteriormente, o nervo foi pinçado duas vezes por 10s com 5s de intervalo entre eles por meio de uma pinça de relojoeiro número cinco (DL Micof). Em seguida, a fáscia e pele foram suturadas. Este procedimento promove a desnervação dos músculos do membro posterior, incluindo o TA. O mesmo pesquisador realizou o procedimento de desnervação para assegurar que a lesão ocorresse no mesmo local e com duração e pressão similares em todos os animais dos grupos desnervados. Este modelo de lesão nervosa é caracterizada pela degeneração axonal e nenhum sinal de reinervação muscular durante os 10 dias após a lesão nervosa (CARMIGNOTO et al., 1983; CARTER et al., 1998).

Procedimentos para a avaliação da excitabilidade muscular e para a estimulação elétrica

A estimulação elétrica foi realizada como descrita anteriormente (RUSSO et al., 2004, 2007, 2008). Brevemente, após a pele ser tricotomizada e coberta por uma camada de gel condutor, dois eletrodos foram posicionados: um eletrodo indiferente (eletrodo circular e auto-adesivo com 5 cm de diâmetro) foi posicionados no dorso do animal, e um eletrodo ativo (um eletrodo metálico, 3 mm de diâmetro) foi utilizado para estimular o músculo TA (CUMMINGS, 1990). Durante o procedimento de EE, este eletrodo foi mantido em contato com a pele perpendicular às fibras do músculo TA.

Os parâmetros elétricos (reobase, cronaxia e acomodação) foram avaliados antes de cada tratamento. Os valores identificados durante a avaliação elétrica foram utilizados para determinar os parâmetros de cada sessão de EE (RUSSO et al., 2004, 2007, 2008). Para cronaxia > 1 ms, a corrente monopolar exponencial foi utilizada (frequência de 50 Hz; duração de pulso, duas vezes o valor cronaxia; tempo ON: 1s e OFF: 3s).

Após a avaliação da excitabilidade muscular, a amplitude necessária para induzir a contração máxima do músculo TA (máxima dorsiflexão da articulação tibio-társica direita) foi identificada. Cada sessão diária de EE consistiu de 200 contrações máximas do músculo TA, realizada durante 6 dias, iniciando 24 horas após o procedimento de desnervação. Estas contrações máximas diárias foram realizadas em quatro séries de 50 contrações com 3,2 min duração cada uma, e 10 minutos de intervalo (sem EE) entre as séries, a fim de minimizar fadiga muscular (CUMMINGS, 1990). O protocolo de EE pode ser visualizado no diagrama abaixo (Figura 1). Trabalhos recentes mostraram que 200 contrações diárias são efetivas para manter a massa e a força muscular (DOW et al.,

2004) bem como amenizar a expressão de genes relacionados ao trofismo muscular aumentados com o processo de desnervação (KOSTROMINOVA et al., 2005).

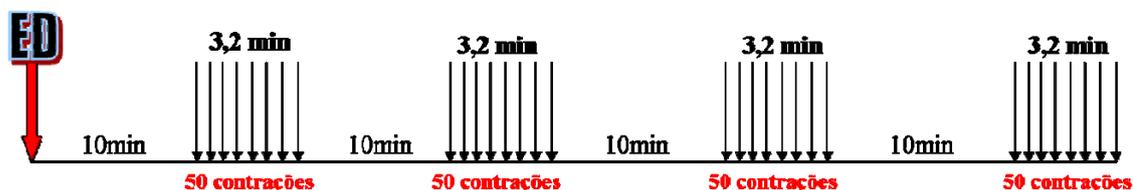


Figura 1: representação esquemática da sessão de estimulação elétrica incluindo o eletro diagnóstico (ED). As setas representam as séries de EE de uma única sessão.

Alongamento muscular

Após o rato ser anestesiado, o tornozelo esquerdo foi mantido fixado por meio de um pedaço de fita em flexão plantar máxima para alongar o músculo TA direito (modificado de GOMES et al., 2006). Cada sessão de alongamento foi realizada uma vez por dia e consistiu de quatro séries de 3,2 minutos cada, com 10 minutos de intervalo entre elas, a fim de mimetizar o período de tempo utilizado no protocolo de EE e para permitir posteriores comparações entre EE, alongamento e a sua associação (EE+Al). O pedaço de fita foi removido durante o intervalo de descanso.

Associação entre EE e Alongamento

Para verificar a associação entre a EE e o alongamento o músculo TA direito foi submetido a ambos os estímulos concomitantemente (D+EE+Al). Os músculos TA foram mantidos em posição alongada máxima por um pedaço de fita como descrito acima e, em seguida, submetidos à EE como descrito anteriormente (4 séries de 3,2 min

com intervalo de 10 min). O pedaço de fita foi removido durante o intervalo de descanso.

Avaliação Muscular

Os animais foram pesados e os músculos TA direitos foram cuidadosamente dissecados e removidos. Os músculos foram então divididos em duas partes iguais no ventre muscular. O fragmento distal foi utilizado para as medidas da AST e congelado em isopentano. A porção proximal foi dividida em dois novos fragmentos, um para análise de RNAm e a outra para a análise de zimografia. Estes fragmentos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C (Forma Scientific, Marietta, OH).

Área de Secção Transversa (AST)

Da região medial de todos os músculos TA foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados ($10\ \mu\text{m}$) em micrótomo criostato (-25°C). As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com azul de toluidina para avaliação morfométrica. Foram obtidas imagens de 5 regiões diferentes por meio de um microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (aumento de 10X) acoplado a uma câmera digital (Sony DSC S75, Tóquio, Japão). A AST de 70 de fibra aleatórias de cada foto foi medida utilizando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), totalizando 350 fibras musculares por animal.

Porcentagem da área densidade do tecido conjuntivo

Para essa análise foi utilizado o sistema de planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al., 1981), sendo a quantificação realizada por meio de um

retículo com quadrados de $2500 \mu\text{m}^2$ contendo 56 intersecções de reta. Foram contados os pontos coincidentes no endomísio e perímísio, em 5 áreas por corte, sendo 5 cortes por animal (aumento de 10X), perfazendo um total de 1400 pontos por animal.

Preparação dos estratos teciduais para zimografia

A metodologia empregada foi adaptada de MARQUETI et al. (2006). Vinte e cinco miligramas de músculo foram lavados com salina gelada e incubadas em 2 mL de tampão de extração (10 mM de ácido cacodílico, pH 5,0; 150mM de NaCl; $1\mu\text{M}$ de ZnCl_2 ; 20mM de CaCl_2 ; 1,5mM de NaN_3 e 0,01% de Triton X-100) à 4°C sob contínua agitação durante 24h. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit BCA^{TM} Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante.

Zimografia

Resumidamente, iguais quantidades de proteína total ($30 \mu\text{g}$ / poço) compostas por um pool de 5 músculos por grupo ($6 \mu\text{g}$ por animal) foram submetidas à eletroforese em triplicata. Os géis de zimografia consistiram de géis de poliacrilamida (10%) com gelatina (100mg/ml) na presença de SDS sob condições não-reduzidas. A eletroforese (100 V) foi realizada até o corante atingir a base do gel. Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes durante 20 minutos em solução de 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. Em seguida, os géis foram incubados em tampão de substrato (50mM de Tris-HCl, pH 8,5; 5mM de CaCl_2 e 0,02% NaN_3) à 37°C por 20 horas. Os géis foram então corados em azul de Coomassie R-250 por 30 min e descorados em metanol e ácido acético por 20 min. As enzimas degradantes de gelatina foram visualizadas como bandas claras contra um fundo azul, indicando a proteólise do substrato. As amostras também foram realizadas na presença de 15mM EDTA que inibiu a atividade das

MMPs confirmando a sua existência. A massa molecular das MMPs foi determinada por comparação com o marcador de massa molecular de proteína PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON). As bandas de atividade foram identificadas de acordo à descrição de CARVALHO et al (2006), com os seus pesos moleculares de 72 kDa: pró-MMP-2; 64 kDa: intermediária-MMP-2; 57 kDa: ativa-MMP-2).

Análise Densitométrica

A análise densitométrica das bandas da MMP-2 identificadas na zimografia foi realizada utilizando o software Gene Tools versão 3,06 (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Extração e análise do RNAm

Um fragmento congelado de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA isolado foi determinada pela razão entre as absorbâncias à 260 e 280 nm (razão > 2,2). Também foi avaliada a qualidade do material por eletroforese das amostras em gel desnaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico).

Transcrição Reversa

A reação da transcrição reversa (RT) contendo 1 µg de RNA total, 1µl de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água (para volume de 10,5µl) foram incubados a 70°C por 10 min e então resfriados rapidamente em gelo. Adicionou-se a cada amostra uma mistura contendo: 1µl de dNTPmix (deoxynucleotide triphosphate) contendo 0.2

mmol·L⁻¹ de cada dNTP (ATP, CTP, GTP e TTP) (Promega, Madison, WI), 2µl de DTT 0.1 mol·L⁻¹, 4µl de tampão 5x e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI) e então as amostras foram reaquecidas a 42°C por 60 min e a 95°C por 10 min.

Primers

Os oligonucleotídeos que foram utilizados como primers foram desenhados para o gene GAPDH (GenBank, AF106860) utilizando o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). A seqüência do primer da MMP-2 foi descrita por MENON et al (2005) e todas as seqüências foram sintetizadas utilizando a Imprint. As seqüências usadas foram: GAPDH (forward: GATGC-TGGTGCTGAGTATGTCG; reverse: GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA); e MMP-2 (forward: CTGATAACCTGGATGCAGTCGT; reverse: CCAGCCAGTCC-GATTTGA), ambas de rato.

Análises das reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Os níveis de RNA transcrito para os diferentes grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações foram realizadas em duplicata em um equipamento que monitora a geração de amplicons em tempo real (PCR *real-time*, Rotor Gene 3000, Cobert Research, San Francisco, E.U.A.) utilizando SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 180 nM de cada primer em um volume final de 50 µl. As condições de ciclagem consistiram para MMP-2 e GAPDH de 10 min à 95°C seguida por 40 ciclos cada de 15s à 94°C, 30s à 48°C para MMP-2 e à 56°C para GAPDH, respectivamente, e 1 min à 72°C, seguido por 10 min à 72°C. Os dados foram analisados usando o método comparativo do ciclo limiar (Ct). A expressão do gene alvo foi normalizada com o gene GAPDH, uma vez que este gene não é alterado pela

desnervação (DEMESTRE et al., 2005; HUGHES et al., 2002). Além disso, foi utilizado um controle negativo contendo RNA, mas não M-MLV RT, para garantir que o produto do PCR não estava amplificando DNA genômico (SCHWARTZ et al., 2005).

Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos aos testes de Normalidade e Homogeneidade (Shapiro-Wilk's W e Levene, respectivamente) seguido por ANOVA e teste post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p > 0.05$.

RESULTADOS

Distribuição da AST das fibras musculares. Houve uma diminuição da AST das fibras musculares em todos os grupos desnervados comparado ao grupo N (Figura 2). Os grupos desnervados concentraram a maioria da AST das fibras entre 1000 a 4000 μm^2 , estando mais de 50% da AST de suas fibras entre 1000 e 2000 μm^2 , enquanto no grupo N a distribuição foi mais heterogênea (Figura 2).

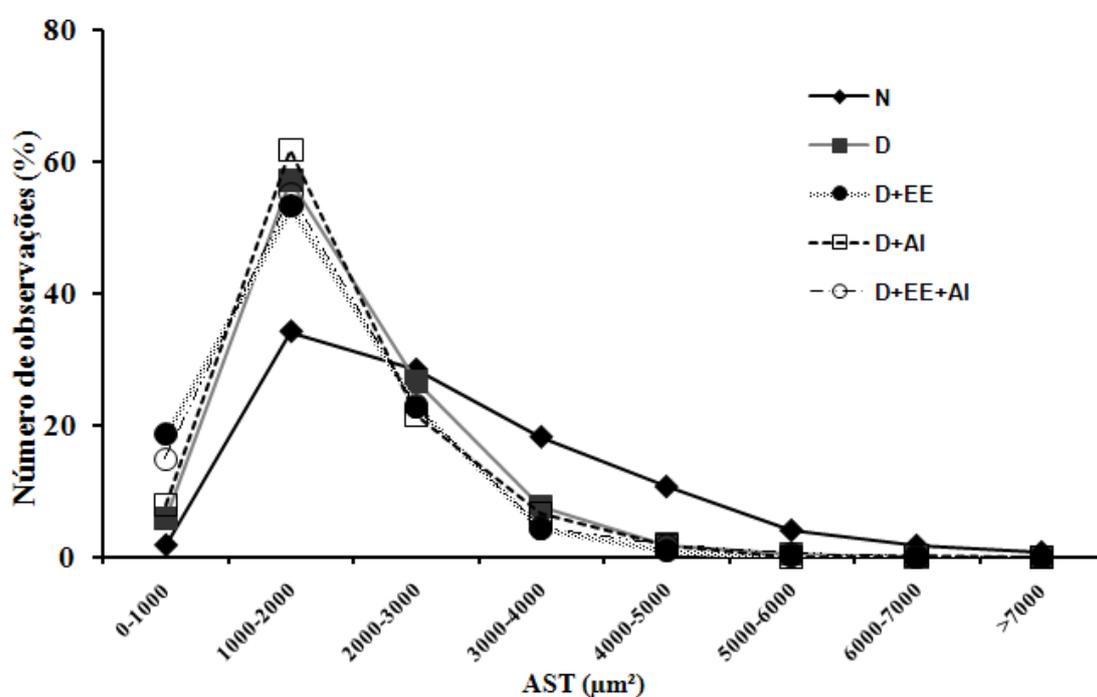


Figura 2: Distribuição da AST das fibras. N: músculo TA normal, D: músculo TA desnervado; D+EE: músculo TA desnervado submetidos à estimulação elétrica (ES) diária; D+Al: músculo TA desnervado submetidos ao alongamento (Al) diário; D+EE+Al: músculo TA desnervado submetido à EE e ao Al concomitantemente. Note que os grupos desnervados apresentaram atrofia das fibras musculares com AST predominantemente inferior a 4000 μm^2 .

Densidade do tecido conjuntivo. Não foi observada diferença na densidade do tecido conjuntivo (N: $9,77 \pm 0,7$; D: $11,13 \pm 0,7$; D+EE: $9,3 \pm 1,4$; D+Al: $10,1 \pm 1,2$; D+EE+Al: $9,6 \pm 0,9$, $p > 0,05$).

Zimografia. A atividade da MMP-2 mostrou três bandas bem definidas (72 kDa / pró-MMP-2; 64 kDa / intermediária-MMP-2; e 57 kDa / ativa-MMP-2) em todos os grupos (Figura 3). Nos grupos D+Al e D+EE+Al a atividade da MMP-2 aumentou nas bandas pró (Figura 3A), intermediária (Figura 3B) e ativa (Figura 3C) em comparação aos grupos N, D, D+ES ($P < 0,01$). Nenhum dos grupos apresentou atividade da MMP-9.

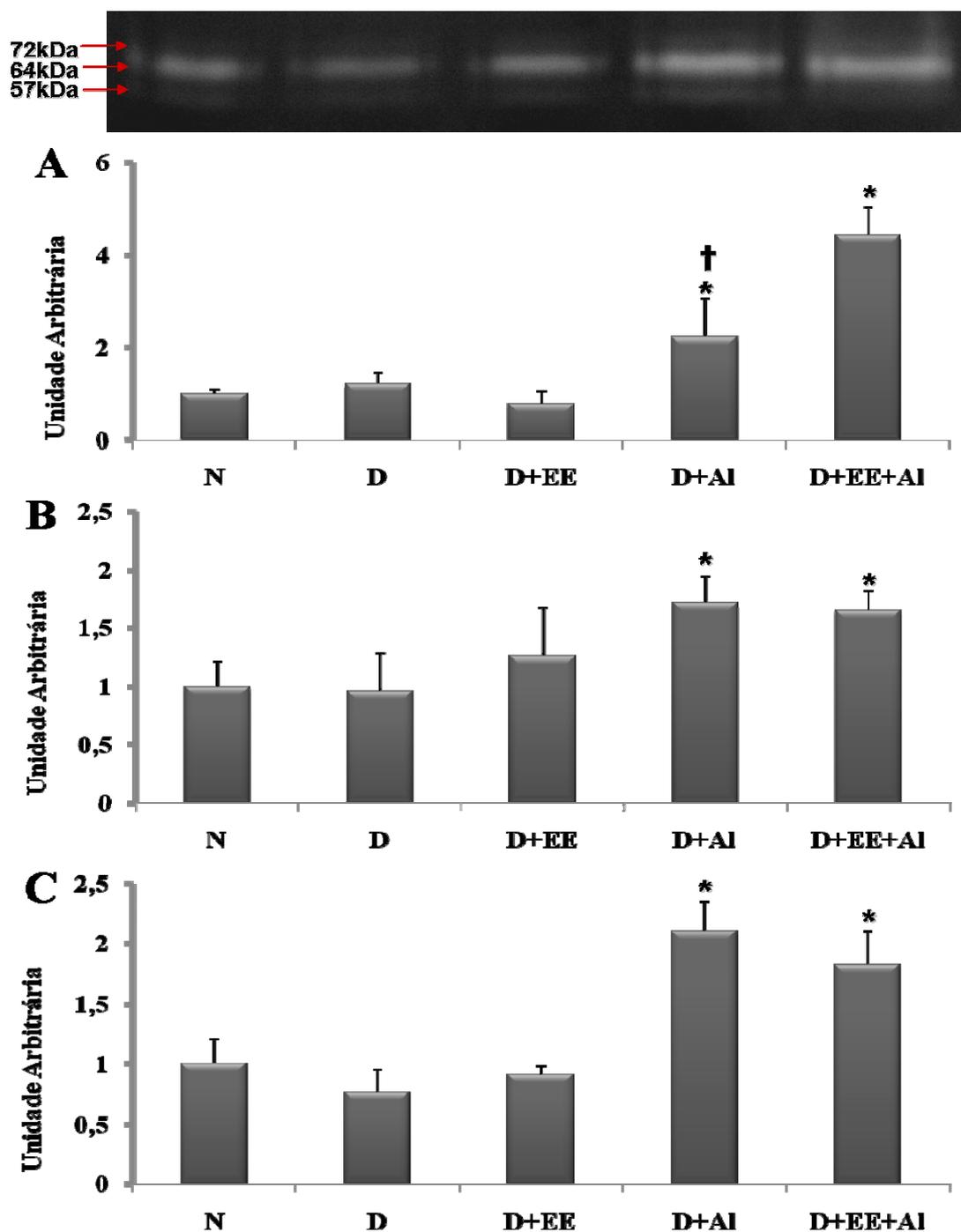


Figura 3: Densitometria quantitativa da zimografia das bandas da MMP-2 em unidades arbitrárias. Para descrições dos grupos ver legenda da figura 2. (A) MMP-2-pró (72 kDa); (B) MMP-2-Intermediária (64 kDa); (C) MMP-2-ativa (57 kDa). * $P < 0,05$: N. comparado a † $P < 0,05$: comparado a D+EE+AI. Notar que a atividade da MMP-2 foi aumentada nos grupos D+AI. e D+EE+AI. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.

Expressão gênica da MMP-2. A estimulação elétrica, o alongamento, bem como de sua associação, aumentaram a expressão gênica da MMP-2 no músculo desnervado comparado ao grupo N (D + ES, $P = 0,004$; D + AL, $P = 0,004$; D + ES + AL, $P = 0,04$) e o grupo D ($P < 0,05$; Figura 4).

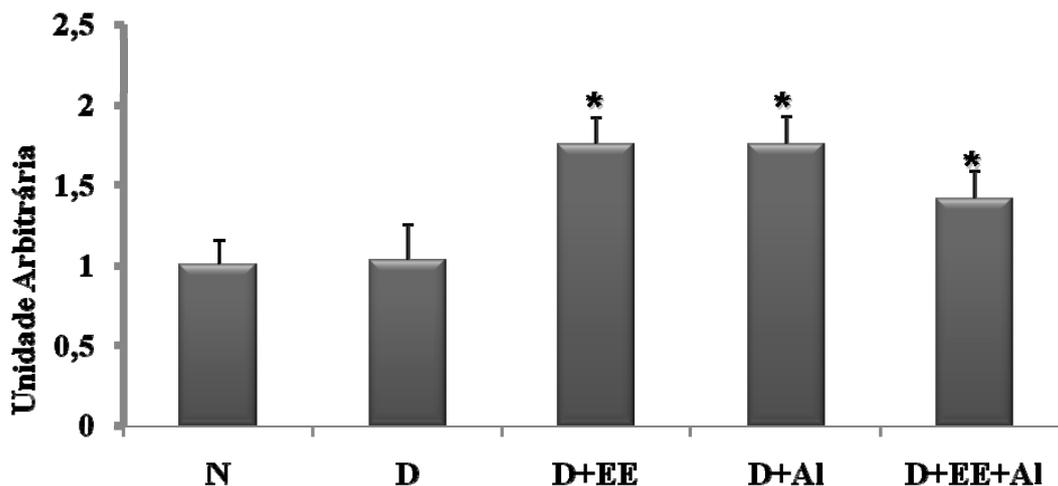


Figura 4: Níveis de RNAm da MMP-2 no músculo tibial anterior (TA) de rato. Os dados estão em média \pm desvio padrão. Para descrições dos grupos ver lenda figura 2. * $P < 0,05$ comparado a N. Observar: EE, AI e sua associação aumentou a expressão gênica da MMP-2 do músculo TA desnervado.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a expressão gênica da MMP-2 foi aumentada pela EE, o alongamento e sua associação quando aplicada na fase inicial da desnervação muscular. Além disso, o alongamento isoladamente ou em associação à EE foi capaz de aumentar a atividade da MMP-2 no músculo desnervado de rato. No entanto, é importante notar que a EE sozinha não foi capaz de alterar a atividade da MMP-2, sugerindo que o alongamento é um estímulo mais efetivo no aumento da atividade da MMP-2 do que a contração muscular induzida pela EE.

Estudos prévios (DEMESTRE et al., 2005; KHERIF et al., 1998) descreveram o comportamento das MMPs no músculo esquelético após compressão do nervo ciático. KHERIF et al. (1998) mostraram que a atividade da MMP-2 permanece inalterada, enquanto que a atividade da MMP-9 foi discretamente detectada no músculo gastrocnêmio 7 dias após de lesão nervosa. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de KHERIF et al. (1998) uma vez que não foram observadas mudanças na atividade da MMP-2 nem detectada a presença da MMP-9 no músculo desnervado 7 dias após compressão nervosa.

A EE tem uma importante aplicação terapêutica na reabilitação muscular incluindo aprendizagem motora, fortalecimento muscular, prevenção de atrofia muscular entre outras (SHEFFLER e CHAE, 2007). Recentemente, DOW et al. (2004) e KOSTROMINOVA et al. (2005) mostraram que 200 contrações musculares crônicas eletricamente induzidas por eletrodos implantados são capazes de evitar a atrofia e degeneração muscular. No presente estudo, 200 contrações diárias também foram utilizadas para tratar músculos desnervados, porém foram utilizados eletrodos de superfície bem como realizada a avaliação da excitabilidade muscular após desnervação. Além disso, a intervenção foi realizada em uma única sessão por dia

caracterizando um tratamento intermitente, de modo a mimetizar o que é normalmente realizado na reabilitação em humanos.

De acordo com o resultados, a EE foi capaz de aumentar os níveis de RNAm da MMP-2, sugerindo que esse recurso pode atuar na regulação desta via. Poucos estudos avaliaram o papel das MMPs no músculo desnervado submetidos à EE. KOSKINEN et al. (2000) observaram um aumento da atividade da MMP-2 associado a uma diminuição do colágeno tipo IV após 18 meses de EE por eletrodos de superfície em indivíduos com lesão medular, indicando um processo de remodelamento do colágeno intramuscular, por meio da atividade da MMP-2 no músculo esquelético. Por outro lado, os resultados apresentados aqui sugerem que a EE não é capaz de ativar a MMP-2 na fase inicial da desnervação muscular. As diferenças entre estes dois estudos podem estar relacionadas com os diferentes protocolos de EE (tempo e frequência de estimulação), bem como os modelos experimentais.

Um estudo recente do nosso laboratório (RUSSO et al., 2008) mostrou que a EE (20 contrações, frequência de 20Hz, TON = 3s e TOff = 6s) realizada por eletrodos de superfície também foi capaz de aumentar a expressão gênica da MMP-2, sugerindo EE poderia ser uma estratégia terapêutica para facilitar o crescimento do nervo e agir no remodelamento da MEC, corroborando com os resultados do presente estudo. Assim, apesar de algumas importantes diferenças observadas entre RUSSO et al. (2008) e o presente estudo, tais como o número de contração, frequência, tempo e tipo de desnervação, ambos viram apenas alterações na expressão da MMP-2.

Além disso, apesar de ambos os estudos indicarem que a EE aplicada por eletrodos superficiais é capaz de regular a via da MMP-2, nenhum dos protocolos, ou seja, 20 ou 200 contrações, foi capaz de minimizar a atrofia muscular. Apesar de DOW et al (2004) mostrarem que 200 contrações minimizaram a atrofia, é importante salientar as

diferenças entre os protocolos como a utilização de eletrodos implantados e as contrações musculares distribuídas ao longo do dia. Provavelmente, o intervalo de descanso entre cada sessão de EE é determinante para evitar a atrofia. Longos períodos de descanso entre as contrações podem ser suficientes para iniciar as mudanças na regulação da expressão gênica e protéica que inicia o processo de atrofia induzida pela desnervação (DOW et al., 2005).

O alongamento ou o aumento de tensão muscular tem sido descrito como o principal fator para ganhos de massa muscular (SAKAKIMA e YOSHIDA, 2003). GOLSDPINK et al. (1992) mostraram que o alongamento é um estímulo eficaz no aumento da síntese de mioproteínas. Apesar de poucos estudos avaliarem os efeitos do alongamento no músculo desnervado, há evidências que o aumento da carga mecânica através do alongamento atenua as alterações induzidas pela desnervação na morfologia muscular (SAKAKIMA e YOSHIDA, 2003) e na expressão gênica da cadeia pesada da miosina (MHC) (LOUGHNA e MORGAN, 1999).

Segundo nosso conhecimento, existe pouca informação a respeito dos efeitos do alongamento sobre as MMPs. AHTIKOSKI et al. (2003) mostraram um aumento tanto no RNAm como na atividade da MMP-2 nos músculos sóleo, gastrocnêmio e EDL após imobilização em posição alongada e encurtada por 1, 3 e 7 dias, mas nenhuma atividade da MMP-9 foi observada. Interessantemente, os presentes resultados mostraram que poucos minutos de alongamento diário foram capazes de aumentar tanto expressão como a atividade da MMP-2 no músculo desnervado. Estes resultados não só trazem novas contribuições para melhor compreensão das vias envolvidas na adaptação à tensão muscular, mas também são úteis para delinear estratégias de tratamento para reabilitar músculos desnervados. Além disso, a associação da EE ao alongamento não potencializou os efeitos do alongamento. Desse modo, é possível hipotetizar que a

tensão gerada pelo alongamento é o estímulo preponderante para ativar a MMP-2, em comparação à EE. No entanto, estudos em fibras musculares isoladas poderiam esclarecer esta hipótese.

Este estudo indica que a EE, o alongamento e a sua associação são capazes de aumentar a expressão gênica da MMP-2 na fase inicial da desnervação. Além disso, a tensão gerada pelo alongamento, associada ou não à EE, aumentou a atividade da MMP-2 no músculo desnervado de rato. Estes achados são relevantes uma vez que protocolos clínicos, semelhantes aos utilizados na reabilitação do músculo desnervado em humanos, foram utilizados neste estudo para investigar os efeitos desses recursos terapêuticos na adaptação do músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

1. AHTIKOSKI, A.M., KOSKINEN, S.O., VIRTANEN, P., KOVANEN, V., RISTELI, J., AND TAKALA, T.E. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. **Acta Physiol Scand**, 177:473-481, 2003.
2. AHTIKOSKI A.M., TUOMINEN H., KORPELAINEN J.T., TAKALA T.E., OIKARINEN A. Collagen synthesis and degradation in polyneuropathy and myopathies. **Muscle Nerve**, 30:602-608, 2004.
3. ARRUDA E.M., MUNDY K., CALVE S., BAAR K. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen II mRNA in the extracellular matrix of muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 292:983-987, 2007.
4. ASHLEY Z., SUTHERLAND H., LANMULLER H., UNGER E., et al. Determination of the chronaxie and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. **Artif Organs**, 29:212-215, 2005.
5. BODINE S.C., LATRES E., BAUMHUETER S., LAI V.K., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, 294:1704-1708, 2001.
6. CARMIGNOTO G., FINESSO M., SILIPRAND R., GORIO A. Muscle reinnervation – I restoration of transmitter release mechanisms. **Neuroscience**, 8:393-401, 1983.
7. CARTER A.J., KRISTMUNDSDOTTIR F., GILMOUR J., GLASBY M.A. Changes in muscle cytoarchitecture after peripheral nerve injury and repair. A quantitative and qualitative study. **J Hand Surg**, 23:365-369, 1998.
8. CARVALHO R.F., DARIOLLI R., JUSTULIN JUNIOR L.A., SUGIZAKI M.M., POLITI OKOSHI M., CICOGNA A.C., et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. **Int J Exp Path**, 87:437-443, 2006.

9. CUMMINGS J. Electrical stimulation in denervated muscle. In: Gersh M, editor. *Electrotherapy in Rehabilitation*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone. p 269-290, 1990.
10. DEMESTRE M., ORTH M., WELLS G.M., GEARING A.J., HUGHES R.A., GREGSON N.A. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 31:545-555, 2005.
11. DOW D.E., CEDERNA P.S., HASSETT C.A., KOSTROMINOVA T.Y., FAULKNER J.A., DENNIS R.G. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, 30:77-86, 2004.
12. DOW D.E., FAULKNER J.A., DENNIS R.G. Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. **Artif Organs**, 29:432-435, 2005.
13. GOLDSPINK G., SCUTT A., LOUGHNA P.T., WELLS D.J., JAENCKE T., GERLACH G.F. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. **Am J Physiol**, 22:R356-R363, 1992.
14. GOLDSPINK G. Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. **J Anat.**, 194:323-34, 1999.
15. GOLDSPINK G., WILLIAMS P., SIMPSON H. Gene expression in response to muscle stretch. **Clin Orthop Relat Res**, 1:S146-S152, 2002.
16. GOMES A.R.S., SOARES A.G., PEVIANI S.M., NASCIMENTO R.B., MORISCOT A.S., SALVINI T.F. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil.**, 87:241-246, 2006.

17. GUERIN C.W., HOLLAND P.C. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. **Dev Dyn**, 202:91-99, 1995.
18. HUGHES P.M., WELLS G.M., PERRY V.H., BROWN M.C., MILLER K.M. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. **Neuroscience**, 113:273-287, 2002.
19. JUNGNIKEL, J.; HAASE, K.; KONITZER, J.; TIMMER, M.; GROTHE, C. Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. **J Neurobiol**, 66,940-948, 2006.
20. KHERIF S., DEHAUPAS M., LAFUMA C., FARDEAU M., ALAMEDDINE H.S. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve. **Neuropathol Appl Neurobiol**, 24:309-319, 1998.
21. KOSKINEN S.O., KJAER M., MOHR T., SØRENSEN F.B., SUURONEN T., TAKALA T.E. Type IV collagen and its degradation in paralysed human muscle: effect of functional electrical stimulation. **Muscle Nerve**, 23:580-589, 2000.
22. KOSTROMINOVA T.Y., DOW D.E., DENNIS R.G., MILLER R.A., FAULKNER J.A. Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. **Physiol Genomics**, 22:227-243, 2005.
23. KOUYOUMDJIAN J.A. Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. **Muscle Nerve**, 34:785-788, 2006.
24. KUMAR R., SHARMA S. Remodeling of extracellular matrix protein, collagen by beta-adrenoceptor stimulation and denervation in mouse gastrocnemius muscle. **J Physiol Sci**, 56:87-94, 2006.
25. LICHT S., JORNET A., GARCÍA-ALSINA J. *Electrodiagnóstico & Electromiografía*. Barcelona: Editorial Jims; 1970.

26. LIEBER R.L. Skeletal muscle structural, function & plasticity. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
27. LOUGHNA P.T., MORGAN M.J. Passive stretch modulates denervation induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain mRNA levels. **Pflugers Arch.**, 439:52-5, 1999.
28. MARQUETI R.C., PARIZOTTO N.A., CHRIGUER R.S., PEREZ S.E.A., SELISTRE-DE-ARAUJO H.S. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metalloproteinase activity and affect the remodeling of the Achilles tendon in rats. **Am J Sports Med**, 34:1274-1280, 2006.
29. MATHIEU O., CRUZ-ORIVE L.M., HOPPELER H., WEIBEL E.R. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. **J Microsc**, 121:75-88, 1981.
30. MENON B., SINGH M., SINGH K. Matrix metalloproteinases mediate beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 289:C168-176, 2005.
31. MUIR D. Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor. **Exp Cell Res**, 210:243-252, 1994.
32. NORDSTROM L.A., LOCHNER J., YEUNG W., CIMENT G. The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae. **Mol Cell Neurosci**, 6:56-68, 1995.
33. PEVIANI S.M., GOMES A.R., MOREIRA R.F., MORISCOT A.S., SALVINI T.F. Short bouts of stretching increase myo-D, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve**, 35:363-370, 2007.

34. RUSSO T., FRANÇA C., CASTRO C., SALVINI T.F. Alterations of chronaxie, rheobase and accommodation in denervated skeletal muscle submitted to electrical stimulation. **Braz J Phys Ther**, 8:169-175, 2004.
35. RUSSO T.L., PEVIANI S.M., FRERIA C.M., GIGO-BENATO D., GEUNA S., SALVINI T.F. Electrical stimulation based on chronaxie reduces atrogen-1 and myoD gene expressions in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, 35(1):87-97, 2007.
36. RUSSO T.L., PEVIANI S.M., DURIGAN J.L.Q., SALVINI T.F. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. **Muscle Nerve**, 37:593-600, 2008.
37. YAMADA T., YOSHIYAMA Y., SATO H., SEIKI M., SHINAGAWA A., TAKAHASHI M. White matter microglia produce membrane-type matrix metalloprotease, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. **Acta Neuropathol**, 90:421-424, 1995.
38. SALMONS S., ASHLEY Z., SUTHERLAND H., RUSSOLD M.F., LI F., JARVIS J.C. Functional electrical stimulation of denervated muscles: basic issues. **Artif Organs**, 29:199-202, 2005.
39. SCHWARTZ, P.H.; NETHERCOTT, H.; KIROV, I.I.; ZIAEIAN, B.; YOUNG, M.J.; KLASSEN, H. Expression of neurodevelopmental markers by cultured porcine neural precursor cells. **Stem Cells**, v.23, p.1286-1294, 2005.
40. SCOTT K.A., WOOD E.J., KARRAN E.H. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. **FEBS Lett**, 441: 137-140, 1998.
41. SAKAKIMA H., YOSHIDA Y. Effects of short duration static stretching on the denervated and reinnervated soleus muscle morphology in the rat. **Arch Phys Med Rehabil.**, 84: 1339-42, 2003.

42. SEO, T.B.; HAN, I.S.; YOON, J.H.; HONG, K.E.; YOON, S.J.; NAMGUNG, U.K.
Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. **Med Sci Sports Exerc**, 38: 1267-1276, 2006.
43. SHEFFLER L.R., CHAE J. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation.
Muscle Nerve, 35: 562-590, 2007.