

EDSON DA SILVA

**HISTOMORFOMETRIA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO (HSP-70) EM MÚSCULOS ESTRIADOS DE RATOS
SEDENTÁRIOS, TREINADOS E SUBMETIDOS OU NÃO AO EXERCÍCIO
EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

EDSON DA SILVA

**HISTOMORFOMETRIA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO (HSP-70) EM MÚSCULOS ESTRIADOS DE RATOS
SEDENTÁRIOS, TREINADOS E SUBMETIDOS OU NÃO AO EXERCÍCIO
EXAUSTIVO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

Aprovada: 22 de junho de 2007

Prof. Antônio José Natali
(Co - orientador)

Prof. Sérgio Luís P. da Matta
(Co-orientador)

Prof. Clóvis Andrade Neves

Prof^a Conceição A.dos Santos

Prof^a. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Orientadora)

À professora, orientadora, Dr^a. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, por todo o conhecimento transmitido e construído, pela proposta e colaboração na realização desse trabalho, pelos conselhos. Pela amizade e carinho, principalmente pela pessoa maravilhosa e especial que é, marcando minha passagem por esta pós-graduação. Mas principalmente por abrir as “portas” para a realização desse grande sonho. Serei eternamente grato. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me iluminado com tanta força, calma e perseverança para suportar e vencer os momentos mais difíceis encontrados pelo longo caminho percorrido até aqui.

Aos meus Pais Gedi (*in memoriam*) e Luiza, símbolos de sabedoria e sentimento, por todo o amor, carinho e atenção que dedicaram à minha formação acadêmica e pessoal, tornando esta caminhada possível e repleta de significado.

Aos meus irmãos Luís, Eduardo e Noêmia, estudiosos, dedicados e guerreiros; pelo carinho e força... sempre me encorajando a avançar um pouco mais. Agostinho e a Maria Luiza, agradeço a Deus por fazerem parte de nossa família contagiando-nos com tanta alegria! Especialmente pelo carinho e amizade de todos vocês!

A Leila, pelo companheirismo, amor e dedicação, virtudes estas que me faz a cada dia lembrar do quanto esta é importante em minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Ao Professor, co-orientador, Antônio José Natali, por tornar possível a realização deste trabalho por meio da integração entre o Departamento de Educação Física e o programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Pelos ensinamentos, paciência e pela amizade.

Ao Professor, co-orientador, Sérgio, pelos conselhos e sugestões, pela paciência, pelos ensinamentos e especialmente pela amizade e alegria durante nossas atividades no laboratório e também fora do ambiente de trabalho. Então... Muito obrigado!

Aos Professores do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo uso do analisador de imagem.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural, Izabel, Clóvis, Lino, Adilson e Sérgio, pela convivência, pelos ensinamentos, pelo agradável ambiente de trabalho e profissionalismo.

A todos os Professores do Curso de Biologia Celular e Estrutural, que nos acolheram durante todo o curso de Mestrado, tornando possível a realização deste trabalho.

A Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes pelo uso do Laboratório Biologia Molecular de Plantas.

A professora Catarina Mendes de Jesus do laboratório de Micorrizas/ BIOAGRO - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pelo uso do criostato.

A Patrícia Barcelos e seus estagiários do Departamento de Medicina Veterinária: Bruno, Felipe e Geraldo por participarem do trabalho, pela prestatividade e pelas inúmeras sugestões.

A todos os estagiários da EFI, especialmente Luiz Bozi, Cynthia e Karina pela dedicação na execução do experimento, pelos trabalhos realizados no laboratório e no Biotério. Especialmente pela amizade e adorável convivência.

Aos meus amigos Giselle, Marcos, Max, Cláudia, Rejane, Reggiane, Sirlene, Inez, Patrícia, Jaqueline, Frederico, Bruna, Alex, Talita, Michele, Gláucia, Tati, Fabiano, Vinícius, e todos que estiveram presentes, no trabalho, nos estudos, nos momentos de descontração. Especialmente pela amizade, pela ajuda no experimento, pelos conselhos e pela alegria.

Aos demais colegas da pós-graduação pela agradável convivência.

A Escola Técnica José Rodrigues da Silva, especialmente a coordenadora Márcia, e o Administrador Márcio, sempre me apoiando e remanejando meus horários de trabalho durante grande parte do mestrado. Aos meus ex-alunos, e aos queridos amigos professores, Érica, Gustavo, Fátinha, Rita, Paulo, Rosilei, Sandra, Vanderléia, Cecília, Lílian e Helenice.

Ao Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UFVJM, aos professores e amigos Fernando, Paulo e Rafael, aos meus alunos de graduação; pela compreensão, remanejamento dos meus horários e atividades de docência, facilitando a conclusão deste curso na UFV.

Aos membros da banca, profs. Clóvis, Antônio Natali, Sérgio, Izabel e Conceição, e aos suplentes profs. Tarcizio e Lino, pela disponibilidade de avaliarem este trabalho.

A todos... MEU ETERNO AGRADECIMENTO!

BIOGRAFIA

EDSON DA SILVA, filho de Gedi da Silva (*in memoriam*) e Luiza de Souza e Silva, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, em 05 de junho de 1973.

Em julho de 2001 graduou-se como Bacharel em Fisioterapia pela Fundação Educacional de Caratinga (FUNEC), Caratinga-MG.

Em novembro de 2001, ingressou-se, por meio de concurso público, no quadro de Fisioterapeutas da Secretaria Municipal de Saúde de Ponte Nova, atuando como clínico em reabilitação cardio-respiratória até agosto de 2006.

Professor de Anatomia Humana e Anatomia Radiológica da Escola Técnica José Rodrigues da Silva, entre janeiro de 2002 e setembro de 2006.

Em março de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a dissertação em 22 de junho de 2007.

Em outubro de 2006, ingressou, por meio de concurso público, no quadro de professores do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri, DCB/UFVJM lecionando Anatomia Humana e Fundamentos de Cinesiologia e Biomecânica.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Tecido muscular estriado esquelético e cardíaco.....	4
2.2. Lesão e regeneração do tecido muscular esquelético.....	6
2.3. Lesões musculares induzidas pelo exercício físico.....	7
2.4. A natação como um modelo de exercício físico para ratos.....	8
2.5. Apoptose.....	10
2.6. Proteínas de Choque Térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> - HSP).....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Grupos experimentais.....	17
3.2.1. Grupo CS: controle sedentário.....	17
3.2.2. Grupo SE: sedentário seguido de exaustão.....	17
3.2.3. Grupo TN: 17 semanas de treinamento aeróbio em natação.....	18
3.2.4. Grupo TNE: 17 semanas de treinamento aeróbio em natação seguido de exaustão em natação.....	18
3.3. Programa de treinamento aeróbio em natação.....	18
3.4. Protocolo de exercício exaustivo.....	19
3.5. Coleta de materiais.....	20
3.6. Protocolo para a determinação da concentração de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão.....	20
3.7. Microscopia de luz.....	21
3.8. Reação de TUNEL (<i>Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling</i>).....	21
3.9. Reação para succino-desidrogenase (SDH).....	22
3.10. Anticorpos Monoclonais Anti- <i>Heat Shock Protein 70</i> (HSP70) contra HSP72 de rato.....	22
3.11. Análise morfométrica.....	24
3.12. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24

4.1	Peso corporal dos animais.....	24
4.2.	Peso do coração e dos músculos sóleo e reto femoral.....	27
4.3.	Concentração de Lactato sanguíneo.....	28
4.4	Distribuição (%) de fibras dos tipos I e II nos músculos sóleo e reto femoral.....	30
4.5.	Área das fibras dos tipos I e II nos músculos sóleo e reto femoral.....	34
4.6.	Proporções volumétricas dos componentes do miocárdio.....	
4.7.	Análise histológica dos músculos sóleo e reto femoral.....	39
4.9.	HSP.....	49
5.	CONCLUSÕES.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
7.	APÊNDICE.....	67
	..	

RESUMO

SILVA, Edson da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2007. **Histomorfometria e expressão de proteínas de choque térmico (HSP-70) em músculos estriados de ratos sedentários, treinados e submetidos ou não ao exercício exaustivo.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-orientadores: José Antônio Natali e Sérgio Luís Pinto da Matta.

Sabe-se que a natação promove adaptações benéficas aos sistemas cardiovascular e músculo-esquelético. Porém, o exercício físico exaustivo, porém irregular pode induzir lesões musculares. As células sobre várias condições de estresse, sintetizam quantidades significativas de proteínas de choque térmico ou HSP (*Heat Shock Proteins*). Algumas HSP atuam como chaperonas, enquanto outras têm funções citoprotetoras e anti-apoptóticas. Um dos possíveis efeitos do treinamento físico é o aumento na expressão de HSP 70, a qual pode inibir a apoptose. Neste trabalho foram avaliados os efeitos da natação e do exercício exaustivo sobre a expressão de HSP 70 e a estrutura histológica do miocárdio e dos músculos sóleo (SO) e reto femoral (RF) de ratos *Wistar* treinados e sedentários. Utilizou-se vinte e nove ratos *Wistar*, adultos, com peso médio inicial de 376g. Os animais foram divididos em quatro grupos: CS: controle sedentário sem tratamento (n=8); SE: sedentário seguido de teste de exaustão (n=7); TN: 17 semanas de natação (n=7); TNE: 17 semanas de natação seguido de teste de exaustão (n=7). Os animais dos grupos TN e TNE nadaram 90 minutos/dia, cinco vezes/semana, durante 17 semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de treino, os animais dos grupos CS e TN foram eutanasiados, enquanto os animais dos grupos SE e TNE foram submetidos a um teste de exaustão, e sacrificados 48 horas após a exaustão. Os resultados indicam que o treinamento em natação promoveu adaptações celulares com ocorrência de microlesões nas fibras musculares, aumento da vascularização e diminuição dos níveis de lactato sanguíneo em relação aos animais sedentários. Essas alterações foram mais intensas após a exaustão, sugerindo que o exercício exaustivo pode se constituir num agente agressor.

No entanto, não foram identificadas alterações significativas no que se refere à ocorrência de apoptose, hipertrofia e aumento na expressão de HSP-70.

ABSTRACT

SILVA, Edson da M.Sc., Federal University of Viçosa, June of 2007. **Histomorphometry and expression of Heat Shock Proteins (HSP-70) in striated muscles of sedentary rats, trained and submitted or not to exhaustive exercise.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-Advisers: José Antônio Natali and Sérgio Luis Pinto da Matta.

It is known that swimming is a type of exercise that promotes beneficial adaptations to the cardiovascular and skeletal muscle systems and that exhaustive and irregular physical exercise can induce muscular injuries. The cells, under some conditions of stress, synthesize significant amounts of Heat Shock Proteins or HSPs. Some HSPs act as chaperones, while others have cytoprotective and anti-apoptotic functions. One of the possible effects of the physical training is the increase in the expression of HSP 70, which can inhibit apoptosis. In this work the effect of swimming and the exhaustive exercise on the expression of HSP 70 and the histological structure of the myocardium, soleus (SO) and rectus femoris (RF) muscles of trained and sedentary Wistar rats have been evaluated. Twenty-nine Wistar rats, all adults, were used with initial average weight of 376g. The animals had been separated in four groups: CS: sedentary control without treatment (n=8); SE: sedentary followed by exhaustive test (n=7); TN: 17 weeks of swimming (n=7); TNE: 17 weeks of swimming followed by exhaustive test (n=7). The animals of 5 groups TN and TNE had swum 90 min/day, five days/week, for 17 weeks. The results indicate that swimming training promoted cellular adaptations with occurrence of microinjuries in muscular fibres, increase of the vascularization and reduction of the blood lactate levels in relation to the sedentary animals. These alterations were more intense after the exhaustion, suggesting that the exhaustive exercise can represent an aggressive agent. However, significant alterations relating to the occurrence of apoptosis, hypertrophy and increase in the HSP-70 expression were not been identified.

1. Introdução

O exercício físico desencadeia importantes adaptações bioquímicas, morfológicas e mecânicas nos músculos esqueléticos recrutados (Terjung, 1997; Flück, 2006). Também no músculo cardíaco, o exercício proporciona adaptações que contribuem para reduzir o estresse sobre a parede ventricular (Natali, 2000).

A adaptação do músculo esquelético ao exercício é um fator importante na melhoria do desempenho em esportes competitivos e, ao mesmo tempo, é considerada salutar para aqueles que fazem atividade física sem o intuito de competir. As adaptações são induzidas especificamente nos grupos musculares exercitados e mantidas quando a atividade é contínua. Portanto, a intensidade e a duração do exercício são fatores determinantes nas adaptações musculares (Terjung, 1997).

A utilização de animais de laboratório nos estudos experimentais de fisiologia do exercício constitui-se numa prática freqüente. Pode-se, através destes estudos, simular as condições de estresse físico, freqüentemente observadas em humanos e assim acompanhar as alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes do exercício. O exercício aeróbio ou de *endurance* consiste na realização de atividades físicas prolongadas que predominantemente necessitam do oxigênio para a produção de energia, tais como corrida, ciclismo, remo e natação (Bucci et al., 2005). A natação recruta um grande volume de massa muscular e promove adaptações ao sistema cardiovascular e músculo-esquelético em ratos treinados (Medeiros et al., 2000; Takahashi & Kubota, 2005; American Physiological Society, 2006; Matsakas et al., 2006; Efthmiadou et al., 2006). Além disso, a natação é uma habilidade inata aos ratos e os estudos utilizando esse modelo revelam a ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhantes àquelas observadas em humanos (Papoti et al., 2003).

Há situações em que o exercício também pode induzir lesões nas fibras (Clebis & Natali, 2001; Duarte, 2001) ocasionando desconforto, rigidez e dor muscular (Michael, 1999). Fatores mecânicos desencadeiam as lesões e alguns

mediadores inflamatórios exacerbam esse quadro nos dias subseqüentes ao exercício (Clarkson & Sayers, 1999; Tricoli, 2001). Além disso, o aparecimento destas lesões pode estar relacionado com a presença de espécies reativas de oxigênio - ROS (Koury, 2003), elevação da temperatura corporal e a diminuição do pH resultante do acúmulo de ácido láctico gerado durante o exercício (Smolka et al., 2000; Kregel, 2002).

A atividade física exaustiva pode determinar a morte de fibras musculares sob dois mecanismos distintos: apoptose e necrose (Arends & Wyllie, 1991). Na necrose, há um aumento no volume total da célula e das organelas, seguindo-se a autólise, que envolve dissolução de seus subprodutos, os quais estimulam uma inflamação exsudativa. A necrose é induzida por injúria severa, a exemplo do que pode acontecer sob a ação de hipertermia, hipóxia ou altas concentrações de substâncias tóxicas que geram uma falha catastrófica no metabolismo. Já na apoptose, ocorre redução do volume celular, condensação da cromatina, invaginação das membranas celular e nuclear, ruptura do núcleo em fragmentos e a formação dos corpos apoptóticos (Sanchez-Torres & Vargas, 2003). Existe uma variedade de moléculas intra e extracelulares que regulam a expressão de genes responsáveis pelo processo de apoptose. Segundo Phaneuf & Leewenburgh (2001), o exercício exaustivo pode causar apoptose por induzir dentro da célula muscular, os níveis de diversos agentes apoptóticos, dentre eles, glicocorticóides, cálcio e ROS.

Em geral, as células, sob condições de estresse, sintetizam quantidades elevadas de proteínas de choque térmico (“Heat Shock Proteins” - HSP). No citoplasma, várias HSP têm como função, se ligarem a proteínas parcialmente enoveladas, tornando o processo de enovelamento mais eficiente. Outras HSP têm propriedades anti-apoptóticas (Lee, 2005). Atualmente sabe-se que a atividade física moderada (treinamento frequente) pode atenuar a ocorrência de apoptose em músculo esquelético e cardíaco de ratos (Siu et al., 2004). Um dos fatores de proteção do treinamento é o aumento na expressão de HSP 70, a qual pode inibir a apoptose (Adhietty & Hood, 2003).

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos protetores e a capacidade de adaptação morfofuncional do músculo esquelético e cardíaco submetido ao exercício físico ainda são pouco conhecidos, mas são essenciais para uma adequada prática de atividade física, seja como lazer, esporte ou na reabilitação de pacientes.

Este trabalho foi realizado para avaliar o efeito do treinamento em natação sobre a estrutura histológica do miocárdio e dos músculos sóleo e reto femoral de ratos adultos. Além disso, ratos treinados e sedentários foram submetidos a teste de exercício exaustivo, para verificar se o treinamento em natação poderia exercer efeito protetor anti-apoptótico nos músculos em estudo.

1.1 Objetivos

Em ratos adultos sedentários e treinados, submetidos ou não a teste de exercício exaustivo, o objetivo geral deste trabalho foi verificar a proteção num programa de treinamento em natação, estabelecendo-se os seguintes parâmetros:

- a) Comparar, através de análise histomorfométrica, o miocárdio do ventrículo esquerdo e os músculos sóleo e reto femoral;
- b) Determinar e comparar a concentração da proteína HSP 70 nos músculos sóleo e reto femoral;
- c) Determinar e comparar a concentração de lactato sangüíneo;
- d) Identificar e comparar a ocorrência de núcleos apoptóticos em fibras dos músculos sóleo e reto femoral;
- e) Analisar e comparar a histologia dos músculos sóleo e reto femoral

2. Revisão de literatura

2.1. Tecido muscular estriado esquelético e cardíaco

Os músculos esqueléticos são constituídos basicamente de dois componentes: células multinucleadas e tecido conjuntivo. Cada célula ou fibra (miofibra), sob controle da inervação motora, é responsável pela função contrátil do músculo, enquanto o tecido conjuntivo fornece a estrutura de sustentação. É ainda através do tecido conjuntivo que o músculo recebe o suprimento vascular e nervoso essencial para o seu funcionamento (Järvinem et al., 2005). No desenvolvimento embrionário, as fibras do tecido muscular esquelético se originam da fusão de células uninucleadas denominadas mioblastos. Na fibra esquelética diferenciada de mamíferos, os núcleos são periféricos, situando-se imediatamente abaixo da membrana plasmática ou sarcolema (Carlson & Falkner, 1983). Ao microscópio e em corte transversal, as fibras apresentam formato poligonal ou arredondado. O diâmetro e o comprimento das fibras variam conforme o músculo e a espécie de animal (Junqueira & Carneiro, 2004; Silva & Minamoto, 2005).

Em função das características fisiológicas relacionadas com a velocidade de contração, as fibras esqueléticas são agrupadas em tipos I e II (Chargé & Rudnicki, 2004). As fibras do tipo I apresentam contração lenta, têm grande quantidade de mitocôndrias e rico suprimento de capilares sanguíneos. Além disso, são muito resistentes à fadiga, desde que o fluxo sanguíneo seja mantido. Por outro lado, as fibras do tipo II apresentam contração rápida e menor quantidade de mitocôndrias (Saltin & Gollnik, 1983, *apud* Terjüng, 1997). Com base na presença de diferentes isoformas de cadeias pesadas de miosina, as fibras do tipo II são subdivididas em IIa e IIb (Tabela 1). As fibras IIa têm metabolismo oxidativo elevado e são resistentes à fadiga. Já as fibras IIb têm metabolismo glicolítico e entram em fadiga rapidamente. O organismo adapta-se ao aumento de intensidade do exercício (de suave para moderado a intenso) pela utilização de maior número de fibras, em geral na seguinte ordem: tipo I, tipo IIa e tipo IIb (Andersen et al., 2000). Evidências sugerem a existência de

mudança na relação de fibras do tipo II, com aumento do tipo IIa após o treinamento aeróbio, mas não havendo comprovação da conversão de fibras do tipo II para I após o treinamento (Hawley, 2002).

O sóleo é um exemplo de músculo rico em fibras do tipo I (Hickson et al., 1975; Laughlin, 1984; Chargé & Rudnicki, 2004). Por outro lado, no reto femoral predominam as fibras do tipo II (Laughlin, 1984).

Tabela 1* - Características dos tipos de fibras musculares esqueléticas.

Característica	Tipo de fibra		
	Oxidativa (I)	Glicolítica mista (IIa)	Glicolítica (IIb)
Atividade da ATPase miofibrilar	Baixa	Alta	Alta
Velocidade de contração	Lenta	Rápida	Rápida
Resistência à fadiga	Alta	Intermediária	Baixa
Mitocôndrias	Muitas	Muitas	Poucas
Capacidade oxidativa	Alta	Alta	Baixa
Capilares	Muitos	Muitos	Poucos
Conteúdo de mioglobina	Alto	Alto	Baixo
Cor da fibra	Vermelha	Vermelha	Branca
Conteúdo de glicogênio	Baixo	Intermediário	Alto
Diâmetro da fibra	Pequeno	Intermediário	Grande

*Tabela adaptada de Carvalho & Colares-Buzato (2005).

No músculo estriado cardíaco, as fibras (cardiomiócitos) se encontram distribuídas em várias direções. O cardiomiócito é uma célula alongada, ramificada, com estriações transversais, contendo um ou dois núcleos na posição central (Leite, 2004). Os cardiomiócitos são circundados por uma delicada bainha de tecido conjuntivo, que contém abundante rede de capilares sangüíneos. Uma característica exclusiva do músculo cardíaco é a presença de

discos intercalares, complexos juncionais que aparecem como linhas transversais em intervalos irregulares ao longo da célula e promovem a união e a comunicação química entre os cardiomiócitos. A contração das miofibras cardíacas é involuntária, vigorosa e rítmica (Junqueira & Carneiro, 2004).

2.2. Lesão e regeneração do tecido muscular esquelético

O tecido muscular estriado esquelético é suscetível a lesões tendo em vista sua intensa solicitação durante o cotidiano dos indivíduos. O potencial regenerativo desse tecido, documentado desde a segunda metade do século XVIII, ainda tem sido objeto de pesquisa (Carlson & Faulkner, 1983). Järvinen et al., (2005) classificaram o processo de regeneração muscular em três fases: destruição, reparo e remodelação.

A fase de destruição é caracterizada pela ruptura e necrose de fibras, formação de hematoma entre fibras rompidas e reação inflamatória. A fase de reparo é constituída pela fagocitose do tecido necrosado, regeneração de fibras, produção de tecido conjuntivo cicatricial e neovascularização dentro da área lesada. Nesta fase ocorre ativação, determinação, proliferação e diferenciação das células satélites, encarregadas de restaurar, parcial ou totalmente, as fibras lesadas. Entre os sinais biológicos diretamente relacionados à regulação da atividade dessas células destacam-se as citocinas, os fatores neurotróficos e demais fatores de crescimento liberados durante o processo inflamatório inicial (Grounds, 1991; Hurme & Kalimo, 1992; Rende et al., 2000; Tibdall, 2005). Estas substâncias são capazes de estimular, ou inibir, a proliferação celular assim como influenciar em seu processo de diferenciação (Grounds, 1991). São exemplos de substâncias que exercem efeito inibitório sobre a proliferação e/ou diferenciação das células satélites, o fator transformante de crescimento- β (TGF- β) e o interferon (Bischoff, 1990). As células satélites, uma vez ativadas, adquirem mobilidade e se diferenciam em mioblastos que podem ser incorporados a uma fibra muscular parcialmente

destruída ou então, fundirem entre si, originando os miotubos que se diferenciam em novas fibras (Hawke & Garry, 2001; Chargé & Rudnicki, 2003).

Na fase de remodelação ocorre maturação de fibras musculares regeneradas, contração e reorganização do tecido cicatricial com recuperação da capacidade funcional do músculo (Collins, 2000; Järvinen et al., 2005) e reinervação das fibras regeneradas, caso a inervação da fibra tenha sido comprometida. A reinervação acontece através de brotamentos axonais derivados de terminações nervosas íntegras adjacentes (Carlson & Faulkner, 1983).

A remoção do tecido necrosado e dos produtos de lise celular por macrófagos e polimorfonucleares, constitui um fator determinante no processo de regeneração muscular (Collins, 2000). Entretanto, o papel dos macrófagos na regeneração não se restringe apenas à fagocitose. Atualmente, é reconhecida a sua atuação, na síntese e liberação de moléculas biologicamente ativas, que desencadeiam a instalação do processo inflamatório e ativação das células satélites (Lescaudron et al., 1999; Jejurikar & Kuzon Jr., 2003; Järvinen et al., 2005; Tibdall, 2005).

A revascularização tecidual, temporalmente associada à mionecrose, é responsável pelo restabelecimento da rede vascular para aporte sangüíneo e ocorre da expansão de brotos vasculares de vasos próximos não comprometidos pelo trauma. O estímulo para a sua ocorrência provém do próprio tecido sob hipóxia, desencadeando a proliferação e reorganização das células endoteliais vasculares. O sucesso do processo de regeneração muscular é dependente da eficiência da fase de revascularização, sendo ela responsável pela gênese de um ambiente tecidual favorável à ocorrência das fases subseqüentes do processo regenerativo (Grounds, 1991).

2.3. Lesões musculares induzidas pelo exercício físico.

O exercício físico e o alongamento podem resultar em sofrimento muscular, que basicamente subdivide-se em dois tipos: o que ocorre durante ou

imediatamente após a atividade física e o que persiste por várias horas após a atividade. O sofrimento muscular é explicado, pelo menos, por cinco hipóteses: a do músculo danificado ou rompido; a do tecido conjuntivo danificado; a do acúmulo metabólico ou da pressão osmótica e tumefação; a do ácido láctico; a do espasmo localizado de unidades motoras (Michael, 1999). Acredita-se que tipos específicos de atividades físicas, principalmente aquelas com maior componente excêntrico são os que podem causar maiores danos às miofibras (Tricoli, 2001).

Após exercícios físicos exaustivos é possível identificar lesões nos músculos esqueléticos (Clebis & Natali, 2001; Duarte, 2001). Também em indivíduos destreinados existem evidências de injúria nas fibras musculares, imediatamente após a realização de exercícios (Armstrong, 1990). É possível a observação de desarranjos na estrutura de miofilamentos, de linhas Z, de sarcômeros, desorganização das organelas, rompimento do sarcolema e atividade lisossomal acentuada (Armstrong, 1990; Clebis & Natali, 2001). Também tem sido descrito a vacuolização citoplasmática, áreas de necrose, presença de núcleos centrais, ativação de células satélites e fibroblastos, edema intracelular e reação inflamatória muscular com infiltração de fagócitos, principalmente macrófagos (Duarte, 2001). A perda de proteínas intramusculares para o plasma, dentre elas a enzima creatina cinase, é um indicativo de dano do sarcolema (Armstrong, 1990).

2.4. A natação como um modelo de exercício físico para ratos

A natação recruta grande volume de massa muscular e promove adaptações ao sistema cardiovascular e à musculatura esquelética em ratos adaptados ao treinamento físico (Medeiros et al., 2000; Takahashi & Kubota, 2005; American Physiological Society, 2006; Matsakas et al., 2006). Porém, a natação exige uma vigilância contínua para evitar mudanças no comportamento do animal, isto é, ele pode boiar, reduzir a carga de trabalho, sofrer hipóxia ou produzir um estresse fisiológico durante a natação forçada. Todas estas situações mascaram as adaptações do exercício (American Physiological

Society, 2006). Duas sessões de 3 horas de natação por dia, separadas por repouso de 45 minutos entre cada sessão, são consideradas como exercício prolongado de baixa intensidade para roedores (Terada et al., 2004); enquanto a natação com a adição de peso externo ao corpo do animal, igual a 6% da massa corporal, durante sessão de 60 minutos, corresponde a um exercício de alta intensidade (Peijie et al., 2004).

Fatores ambientais (temperatura da água), sexo, idade, esforço, e a intensidade do exercício podem influenciar o desempenho da natação. As condições experimentais podem ser manipuladas para interferir na magnitude da resposta ao treinamento. Assim, a extensão do regime de treinamento, duração, frequência e intensidade de cada sessão de natação podem ser adaptadas (American Physiological Society, 2006).

A natação também resulta em adaptações no músculo esquelético, consistentes com o aumento de vários fatores, dentre eles, resistência à fadiga, aumento da atividade enzimática mitocondrial (Baar et al., 2002), expressão de enzimas lipogênicas (Ikeda et al., 2002) e capilarização (angiogênese) (Efthimidou et al., 2006; American Physiological Society, 2006). A duração do treinamento tem sido identificada como o principal fator que afeta positivamente a capacidade oxidativa do músculo esquelético. O efeito da carga no treinamento permanece controverso em relação a este parâmetro (Evangalista et al., 2003). Durante a natação prolongada, o recrutamento de fibras dentro de músculos esqueléticos ativos segue uma ordem progressiva. A distribuição do fluxo sanguíneo parece ocorrer primariamente para ativar as fibras dos tipos I, IIa e por último as IIb (Laughlin, 1984).

Gul et al., (2006) sugerem que o coração de ratos tem uma capacidade antioxidante suficiente para lidar com o estresse oxidativo induzido pelo exercício de treinamento com esteira ou natação.

2.5. Apoptose

O termo apoptose foi proposto por Kerr et al., (1972) para descrever um específico padrão morfológico de morte celular, observado em várias situações, dentre elas, nas células eliminadas durante o período de desenvolvimento embrionário, na renovação de tecidos e na atrofia por carência hormonal.

Morfológicamente, a apoptose é caracterizada pela condensação e segregação da cromatina, que passa a ficar marginada contra o envoltório nuclear. A condensação da cromatina é acompanhada por invaginação das membranas celular e nuclear, seguida pela ruptura do núcleo em fragmentos, os quais se tornam circundados por partes do envoltório nuclear. Assim se formam os corpos apoptóticos, que contém organelas íntegras, partes do citoplasma e do núcleo, e ainda expressam marcadores de superfície, que permitem o reconhecimento pelos macrófagos (Hengartner, 2000; Saraste & Pulkki, 2000; Simon & Ramos, 2006) e por células adjacentes ou “fagócitos não profissionais” (Hockenbery, 1995) como células dendríticas, células epiteliais e fibroblastos (Sánchez-Torres & Vargas, 2003). Nesse sentido, Bennett et al. (1995), demonstraram que células musculares lisas podem fagocitar células musculares apoptóticas através do reconhecimento de fosfatidilserina expressa na superfície celular.

Além destas características morfológicas da apoptose, ocorre a fragmentação irreversível do DNA genômico promovida por endonucleases (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). A reação de TUNEL (*T*erminal *d*eoxinucleotidil *t*ransferase *U*racil *N*ick *E*nd *L*abeling), uma das técnicas mais utilizadas na detecção desse tipo de morte celular, marca *in situ* a fragmentação do DNA (Sánchez-Torres & Vargas, 2003).

Apoptose é um tipo de morte que depende da ativação intracelular de endonucleases e caspases (Adams, 2003). Esse mecanismo é essencial para a remoção de células danificadas e potencialmente perigosas em organismos multicelulares, de forma a assegurar a homeostase estrutural e funcional dos

tecidos (Gonçalves, 1998) através de um balanço entre proliferação (Sandri & Carraro, 1999) e morte celular (Adihetty & Hood, 2003; Sánchez-Torres & Vargas, 2003). Segundo Guimarães & Linden (2004), a apoptose é um processo biológico observado tanto em invertebrados quanto nos vertebrados e que requer a regulação coordenada de genes específicos (Steller, 1995), os quais poderão expressar proteínas que iniciam a apoptose (Bax, Fas, p53, etc.) e proteínas que inibem a apoptose (Bcl2, Bcl-XL). Altos níveis de Bcl2 em razão a Bax promovem a sobrevivência da célula, mas a inversão de tais níveis desencadeia a morte celular (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). A apoptose também tem sido identificada em diversas patologias, dentre elas doenças infecciosas, enfermidades neurodegenerativas, câncer e doenças auto-imunes (Randhawa, 2000; Sánchez-Torres. & Vargas, 2003).

As caspases são famílias de proteases que atuam como mediadores centrais da apoptose. Existem dois grupos de caspases: as caspases centralmente envolvidas na apoptose (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10) e outras relacionadas com a caspase-1 (caspase-1, -4, -5, -11, -12 -13, e -14). Aquelas implicadas na apoptose podem ser divididas em dois subgrupos baseando-se em sua estrutura e no aspecto temporal de ativação durante a morte celular: caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9, e -10), e caspases efetoras (caspase-3, -6, e -7) as quais, seletivamente clivam proteínas alvo para produzir características morfológicas e bioquímicas associadas com a apoptose (Maag et al., 2003; Fink & Cookson, 2005).

Em geral, as células apresentam a maquinaria enzimática necessária para executar a apoptose. Esta maquinaria será ativada ou inibida mediante determinadas vias de sinalização celular, visto que constantemente as células recebem sinais que podem levar à vida ou à morte celular (Sánchez-Torres & Vargas, 2003). Múltiplas vias conduzem à apoptose por mecanismos dependentes da ativação de caspases (Fig. 1). As três principais vias dependentes de caspases são: 1ª. via do receptor de morte localizado na membrana e envolvendo a caspase-8; 2ª. via de estresse do retículo endoplasmático, atribuída a ativação da caspase-12 (via não representada na

figura 1) e 3ª. via mitocondrial, na qual vários sinais podem desencadear a liberação de proteínas mitocondriais para o citoplasma onde a caspase 9 é ativada iniciando uma cascata de clivagens das caspases-3, -7 ou -6 (Maag et al., 2003; Guimarães & Lindem, 2004). Entretanto, vias independentes de caspases podem induzir a apoptose por meio de mediadores de outras famílias

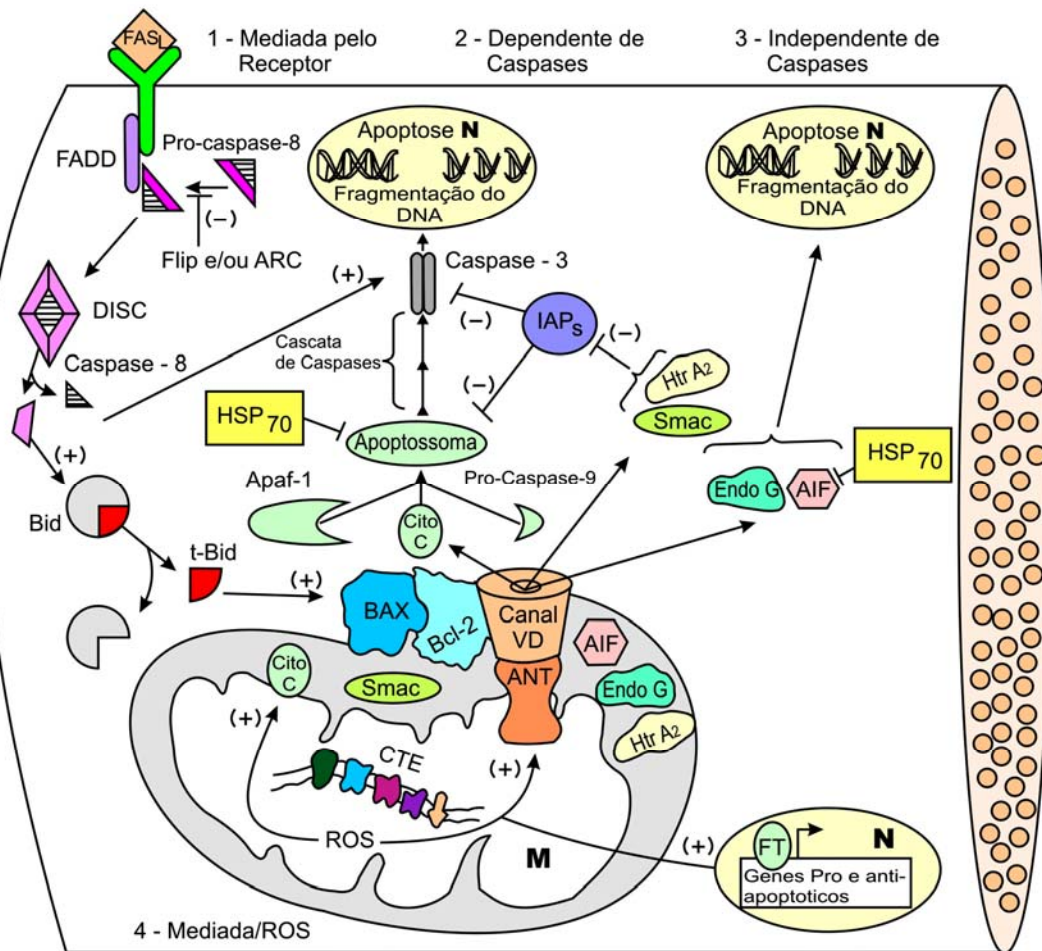


Figura adaptada de Adhietty & Hood, 2003.

Figura 1. Vias intrínseca e extrínseca que desencadeiam a apoptose por mecanismos dependentes ou independentes de caspases. 1) Apoptose mediada pelo receptor. 2) Via apoptótica dependente de caspases. 3) Via independente de caspases. 4) Via mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS).

de proteases (Guimarães & Lindem, 2004). O fator de indução apoptótico (AIF) e a endonuclease G (Endo G) são liberados da mitocôndria e translocados para o núcleo para induzir a apoptose na ausência de caspases (Adhietty & Hood, 2003).

Os sinais intracelulares que podem desencadear a apoptose, em muitos casos, são decorrentes de estresse biológico (Sánchez-Torres & Vargas, 2003), que determina a liberação de citocromo c e de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres de oxigênio – RLO (Adhietty & Hood, 2003). O citocromo c, liberado pela mitocôndria, se combina ao fator de ativação apoptótico 1 (Apaf-1). Este fator, ligado ao citocromo c, recruta a procaspase-9 e este complexo, denominado apoptossoma, desencadeia a ativação de uma série de outras caspases, que constituem um potente mecanismo de amplificação de sinal para a morte apoptótica. A HSP 70 (*heat shock proteins*) pode se ligar ao Apaf-1, um componente do apoptossoma, e conseqüentemente inibir uma via de apoptose dependente de caspases. Além disso, a HSP 70 pode se ligar ao AIF e impedir sua translocação para o núcleo inibindo a apoptose da via independente de caspases. Proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) podem impedir a progressão da sinalização de cascatas apoptóticas ligando-se às caspases-9 e -3, e a liberação de proteínas mitocondriais, tais como *Smac*, *Diablo* e *HtrA2* possam bloquear esta inibição e permitir a progressão da cascata apoptótica. (Adhietty & Hood, 2003). As mitocôndrias representam o sítio primário de produção de radicais livres de oxigênio e a matriz mitocondrial pode apresentar uma concentração de cinco a dez vezes maior de ROS do que o citosol (Cadenas & Davies, 2000; Schneider & Oliveira, 2004). Admite-se que estes radicais possam desencadear o processo de apoptose, além de induzirem a dissociação de citocromo c da membrana mitocondrial interna (Nomura et al., 2000, *apud* Adhietty & Hood, 2003). Por outro lado, os sinais extracelulares representam moléculas que exercem efeito apoptótico ao se ligarem a receptores presentes na membrana plasmática. Segundo Adhietty & Hood (2003), as moléculas mais estudadas são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o ligante Fas (FasL). O FasL recruta a

procaspase-8 ao se ligar a uma proteína adaptadora denominada domínio de morte associado ao Fas (FADD).

A morte apoptótica tem despertado o interesse de especialistas da área de fisiologia do exercício, em função da detecção de apoptose nas fibras de animais submetidos ao exercício físico, sobretudo do tipo exaustivo (Podhorska-Okolow et al., 1998; Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). Os mecanismos envolvidos na ocorrência de apoptose no tecido muscular normal e saudável seguidos ao exercício ainda são pouco conhecidos (Adhihetty & Hood, 2003). Entretanto, núcleos apoptóticos têm sido demonstrados pela técnica de TUNEL no músculo esquelético de ratos após corrida espontânea em roda (Podhorska-Okolow et al., 1998; Arslan et al., 2002). Siu et al. (2004 e 2005) demonstraram os efeitos anti-apoptóticos do exercício em fibras de músculos esquelético e cardíaco de ratos submetidos a treinamento em esteira.

2.6. Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins - HSP)

Os variados tipos de estresse são capazes de ocasionar danos morfológicos, bioquímicos e funcionais às células. Podem desnaturar proteínas celulares maduras, assim como proteínas no processo de maturação (Welch, 1992). As células, sob condições de aumento subletal de temperatura e exercício exaustivo, passam a sintetizar quantidades significativamente elevadas de proteínas de choque térmico ou HSP. Estas proteínas estão presentes em células de eucariotos e procariotos e apresentam uma estrutura altamente conservada sugerindo que elas tenham um papel fundamental nos processos celulares (Kiang & Tsokos, 1998). As HSP mais estudadas apresentam massa molecular de 60, 70, 90 e 100kDa, sendo detectadas em diversos compartimentos da célula (citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo) (Lee, 2005). O aumento subletal de temperatura não é o único estímulo que pode induzir um aumento na síntese de HSP. A exposição de células a certas condições fisiológicas (divisão celular, fatores de crescimento, diferenciação celular, tecidos em desenvolvimento e estimulação

hormonal) patológicas (infecções por vírus, bactérias ou parasitas, febre, inflamação, isquemia, hipertrofia, injúria oxidante, tumores malignos e autoimunidade) e ambientais (choque térmico, metais pesados, inibidores metabólicos, aminoácidos análogos, etanol, antibióticos e radiação) também induzem a expressão de HSP. O aumento da expressão de HSP tem se mostrado protetor em estudos de tecidos e de células em cultura. A proteção, provavelmente, é mediada pela capacidade das HSP funcionarem como chaperonas (Kiang & Tsokos, 1998). A GRP 78 (proteína reguladora de glicose), também referida como BiP, é uma das HSP com ação citoprotetora. Esta proteína é encontrada no RE e apresenta 60% de homologia com a HSP 70. A BiP apresenta propriedades anti-apoptóticas interferindo com a atividade de determinadas caspases (Lee, 2005). Por meio da interação com as procaspases (caspase-7 e caspase-12) a BiP forma um complexo que se associa com a membrana do retículo endoplasmático. Através desta interação a GRP78 atua no RE como um regulador central do balanço entre a sobrevivência e apoptose (Lee, 2005).

As HSP mais abundantes em eucariotos, e mais amplamente estudadas, são as isoformas da família HSP 70 (Welch, 1992; Benjamin & Mcmillan, 1998). A família das HSP 70 contém isoformas que podem ser expressas continuamente, enquanto outras são estritamente induzidas (Kiang & Tsokos, 1998).

As isoformas das HSP 70 encontradas no citoplasma e núcleo são conhecidas como HSP 73 e HSP 72 (Welch, 1992). A HSP 72 é quase ausente em condições normais (Snoeckx et al., 2001) sendo, praticamente, exclusiva de células sob estresse (Welch, 1992; Kregel, 2002) sendo por isso conhecida como a isoforma induzida ou induzível da HSP 70 (Welch, 1992). A HSP 73 é conhecida como HSP 70 constitutiva ou HSP 70 cognata. Essa isoforma é também induzida por estresse, porém muito levemente (Snoeckx et al., 2001) e exercem funções de chaperonas para outras proteínas (Kiang & Tsokos, 1998).

Resumidamente, a família HSP 70 compartilha a função de interagir com outras proteínas no curso da sua maturação e mantê-las no citoplasma,

estabilizando e/ou prevenindo, desta forma, dobramentos prematuros até sua posterior importação pelas organelas apropriadas (Welch, 1992). Assim, as HSP 70 são essenciais para a transferência de novas proteínas para o exterior e interior das membranas mitocondriais (Powers et al., 2001). Também participam do movimento de proteínas através do retículo endoplasmático (Moseley, 1997). Elas facilitam a dobramento (Powers et al., 2001), montagem e desmontagem de outras proteínas (Benjamin & McMillan, 1998) e oferecem termotolerância e aclimatização a outras proteínas (Moseley, 1997).

O exercício físico por si, mais que as condições ambientais ou nocivas, é responsável pela indução de HSP 70 nos músculos estriados (Noble, 2006). Os níveis de RNAm que codificam HSP 70 aumentam nos músculos esquelético e cardíaco após o exercício (Salo et al., 1991).

Diante destes fatos, o exercício parece ser um ótimo instrumento para o estudo do estresse na expressão gênica e do significado fisiológico das proteínas de estresse (Salo et al., 1991).

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 29 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*) Wistar, adultos, com 90 dias de idade, pesando entre 360 a 400g, com média de 376g no início do experimento. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, CCB/UFV. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (4 animais por gaiola), recebendo água e ração própria *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura média de 24°C e regime de luminosidade de doze horas de escuridão por doze horas de claridade. Os animais foram pesados no início do

experimento, semanalmente durante a fase de treinamento em natação e no dia da eutanásia.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram alocados aleatoriamente em 4 grupos:

Grupo CS: controle - sedentário sem tratamento, n = 8

Grupo SE: sedentário seguido de exaustão, n = 7

Grupo TN: 17 semanas de treinamento em natação, n = 7

Grupo TNE: 17 semanas de treinamento em natação, seguidas de um teste de exaustão em natação, n = 7

No sentido de verificar a influência do treinamento sobre determinados parâmetros, os resultados foram agrupados em dois tratamentos: “animais sedentários” (S) e “animais treinados” (T). Os sedentários se referem aos ratos dos grupos CS e SE. Os animais treinados, por sua vez, correspondem aos grupos TN e TNE.

3.2.1. Grupo CS - controle sedentário

Composto por 8 animais que foram mantidos em gaiolas coletivas comuns, sem restrição de água e sem intervenções, eutanasiados quando atingiram o período de 17 semanas, com peso entre 360g e 400g, com média de 375g.

3.2.2. Grupo SE - sedentário seguido de exaustão

Composto por 7 animais com as características físicas semelhantes ao do grupo A, e com peso no início do experimento entre 360g e 400g, com média de 371g. Os ratos foram mantidos durante um período de 17 semanas e, depois foram forçados a nadar até a exaustão suportando um peso de 4% de seu peso

corporal, que foi atado ao corpo (Venditti & Di Meo, 1996). Foram eutanasiados 48 horas após a exaustão.

3.2.3. Grupo TN - 17 semanas de treinamento aeróbio em natação

Composto por 7 animais com características físicas dos grupos anteriores, com peso inicial entre 360g e 380g e média de 377g. Após a última sessão de natação, os animais ficaram alojados em suas gaiolas por um período de 48 horas e, depois sacrificados.

3.2.4. Grupo TNE - 17 semanas de treinamento aeróbio em natação, seguido de exaustão em natação.

Composto por 7 animais com características físicas dos grupos anteriores, com peso inicial entre 360g e 400g e média de 380g. Após a última sessão de natação, os animais ficaram alojados em suas gaiolas por um período de 48 horas e, depois, foram forçados a nadar até a exaustão suportando um peso de 4% de seu peso corporal, que foi atado ao seu corpo (Venditti & Di Meo, 1996). Foram eutanasiados 48 horas após a exaustão.

3.3. Programa de treinamento aeróbio em natação

O protocolo de exercício foi adaptado de Bolter & Gordon (1983), com treinamento progressivo de natação. O treinamento foi realizado num tanque de alvenaria azulejado (largura: 65 cm, comprimento: 75 cm, altura: 85 cm), a altura da água a 45 cm (Fig. 2). A temperatura da água foi mantida em $32^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Nadaram simultaneamente 8 animais em cada tanque. O programa de treinamento foi composto de uma sessão diária, 5 dias por semana e durou 17 semanas. As sessões de treinamento começaram com duração de dez minutos, sendo aumentadas de dez minutos a cada dia, chegando aos noventa minutos no nono dia, e mantidas assim, até o final do experimento. Os animais

exercitaram sem sobrecarga adicional. Esta atividade é considerada uma atividade aeróbia (Peijie et al., 2004), ou seja, abaixo do limiar de lactato (Gobatto et al., 2001).



Figura 2. Animais em treinamento. Ratos *Wistar* em sessão de treinamento em natação, num tanque de alvenaria azulejado, com a temperatura da água mantida em $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.4. Protocolo de Exercício Exaustivo

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais dos grupos SE e TNE foram submetidos a um teste exaustivo em natação. Os animais foram forçados a nadar até a exaustão, suportando um peso de 4% do peso corporal fixo ao corpo (Vendetti & Di Meo, 1996). A exaustão foi definida como o ponto onde o rato permaneceu 10 segundos sob a superfície da água (Dawson & Horvath, 1970).

3.5. Coleta do material

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais dos grupos CS e TN foram eutanasiados para a remoção dos músculos, enquanto, os animais dos grupos SE e TNE só foram sacrificados 48 horas após o teste de exaustão. Os animais foram eutanasiados mediante anestesia profunda com éter etílico, realizando-se a coleta do coração e dos músculos sóleo e reto femoral (direito e esquerdo) de cada animal. Fragmentos dos músculos sóleo e reto femoral do lado direito foram envolvidos individualmente em papel alumínio e plástico, identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido com posterior armazenamento a – 80°C em ultrafreezer para determinação da proteína HSP70.

O coração e os músculos sóleo e reto femoral do lado esquerdo de cada animal foram pesados em balança de precisão para se calcular o peso relativo. O peso relativo do coração foi denominado de índice cardiossomático.

Para o cálculo percentual dos pesos relativos, dividiu-se o valor encontrado para o peso do coração/ou músculo pelo peso corporal do animal.

$$\text{ICS} = \text{PO/PCT} \times 100$$

Onde:

ICS = Índice Cardiossomático;

PO = Peso do órgão (coração ou músculo);

PCT = Peso corporal total.

3.6. Protocolo para a determinação da concentração de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão.

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, todos os ratos dos grupos SE e TNE foram submetidos individualmente a um teste de exaustão em natação. Na sessão do teste de exaustão os animais nadaram continuamente com sobrecarga de 4 % do peso corporal e as amostras de

sangue foram coletadas em três momentos: antes do esforço (repouso), após 15 minutos de esforço (momento 15) e após o final do teste (momento final) (adaptado de Gobatto et al., 2001). Amostras sanguíneas (uma gota) foram coletadas da extremidade da cauda do animal. Para evitar diluição com a água, os animais foram rapidamente secados com uma toalha antes da coleta sanguínea. A concentração de lactato foi determinada utilizando-se o analisador automático de lactato sanguíneo Accutrend Check (Accusport - Roche).

3.7. Microscopia de Luz

Fragmentos dos músculos sóleo e reto femoral do lado esquerdo, bem como do ventrículo esquerdo de cada animal experimental, foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4, para posterior inclusão em resina plástica à base de hidroxietil-metacrilato (Historesin[®]-LEICA) e também em parafina. Os fragmentos musculares, incluídos tanto em historesina quanto em parafina, foram seccionados em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany). Cortes do material incluído em resina plástica, com 2 µm de espessura, foram corados com Azul de Toluidina-Pironina para análise histológica, no intuito de detectar alterações no conjuntivo intersticial, na microvascularização e nas fibras musculares. Já os cortes de material incluído em parafina, com 4 µm de espessura, foram desparafinizados em xilol e hidratados numa série alcoólica decrescente para imediata reação de TUNEL (PROMEGA[®]).

3.8. Reação de TUNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*)

Na reação de TUNEL, os cortes são tratados com um meio de incubação contendo nucleotídeo biotinilado, que por sua vez, se liga às extremidades 3'-OH do DNA fragmentado, através da enzima desoxinucleotidil transferase. Os locais onde o nucleotídeo biotinilado se liga são marcados pelo complexo

peroxidase-estreptavidina. Os cortes, após a incubação, são tratados com um substrato da peroxidase, o peróxido de hidrogênio, e um cromógeno (diaminobenzidina ou DAB). Após este procedimento, os núcleos apoptóticos aparecem corados, ao microscópio de luz, em marrom escuro.

Para a reação foram utilizadas secções histológicas transversais, de fragmentos dos músculos sóleo e reto femoral. As secções, foram submetidas ao método colorimétrico TUNEL, de acordo com as instruções do fabricante (protocolo da reação no Apêndice). Foram utilizados dois tipos de controle positivo: o tratamento de cortes com DNase e também secções de coração de feto de camundongo com 16 dias de idade (Knaapen et al., 2001). O controle negativo consistiu no tratamento de alguns cortes com o meio de incubação sem a enzima desoxinucleotidil transferase.

3.9. Reação para succino-desidrogenase (SDH).

Fragmentos dos músculos sóleo e do reto femoral, foram imersos durante dois minutos em N-Hexana, previamente resfriada em nitrogênio líquido. Em seguida este material foi armazenado à -80°C e posteriormente transferido para a câmara do micrótomo criostato LEICA (MC 1850), para subsequente microtomia à -20°C. Cortes seriados de 25 µm de espessura foram colhidos em lâminas histológicas para a identificação das fibras musculares I e II através da reação para succino-desidrogenase (SDH), de acordo com Sheehan & Hrapchak (1987). Após a reação, a montagem das preparações foi feita com Xarope de Apathy (protocolo da reação SDH e composição do meio de montagem no Apêndice).

3.10. Anticorpos Monoclonais Anti-Heat Shock Protein 70 (HSP70) contra HSP72 de rato

a) *Extração das proteínas* - Fragmentos dos músculos foram retirados do freezer e, após pesagem, foram macerados para obtenção de um extrato

tecidual com adição de tampão (composição: 15 mM Tris HCL; pH 7,5; 600 mM de NaCl; 1 mM PMSF). Em 60 mg de extrato foram adicionados 1200 µl de tampão de extração (relação de 1:20). Em seguida, as amostras foram colocadas em frascos tipo *ependorfs* (2 ml) e mantidas em gelo por 5 minutos. Após este período de incubação, os restos celulares foram descartados por centrifugação a 14.000 g, a 4° C, durante 20 minutos e o sobrenadante foi armazenado a - 20° C.

b) *Quantificação da amostra* -. Os extratos de proteínas totais foram quantificados de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se as 3 réplicas preconizadas.

c) *Eletroforese SDS-PAGE* - Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) contendo detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada essencialmente como descrito por Laemmli (1970), (Protocolo da eletroforese no Apêndice).

d) *Immunoblotting* – As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIORAD (EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência (em aproximadamente 1 hora a 0,70 Amperes constantes), a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de bloqueio (caseína – Non-fat Dry Milk, BioRad) por uma hora. Em seguida, realizaram quatro lavagens, por 15 minutos cada, em temperatura ambiente, com TBS-T [Tris-HCl 0,01 mol/L; pH 7,6; NaCl 1,5 mmol/L; Tween-20 0,1% (v/v)]. Uma membrana foi incubada com o anticorpo Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 (SIGMA), numa diluição 1:5.000, por três, horas sob agitação. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T quatro vezes, por 15 minutos cada e, em seguida, incubada com o anticorpo Anti-Mouse IgG (fosfatase alcalina - SIGMA), numa diluição de 1:10.000, por duas horas. A membrana foi lavada extensivamente com TBS-T, novamente por quatro vezes de 15 minutos cada e, subsequente, incubada com tampão da enzima

(Tris-HCl 0,1 mol/L; pH 9,8; NaCl 0,1 mol/L; MgCl₂ 0,5 mol/L) por dez minutos. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se os substratos NBT (azul-nitro-tetrazolium, GIBCO/BRL) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, GIBCO/BRL).

e) *Densitometria* – As bandas dos *immunoblotting* foram quantificadas por meio de densitometria computadorizada, após serem escaneadas, utilizando-se o software MULTIGAUGE – Versão 3.

3.11. Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada utilizando o programa de análise de imagem (*Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows 98), determinando os seguintes parâmetros: proporção de fibras musculares dos tipos I e II nos músculos sóleo e reto femoral; área das fibras dos tipos I e II, e a frequência de fibras lesadas, focos inflamatórios intersticiais e vasos sanguíneos. Para cada parâmetro foram capturadas 10 imagens de cada animal, utilizando-se o programa *SPOT*, versão 3.5.9, e objetiva com aumento de 20x e zoom de 1,25x. (Fig. 3).

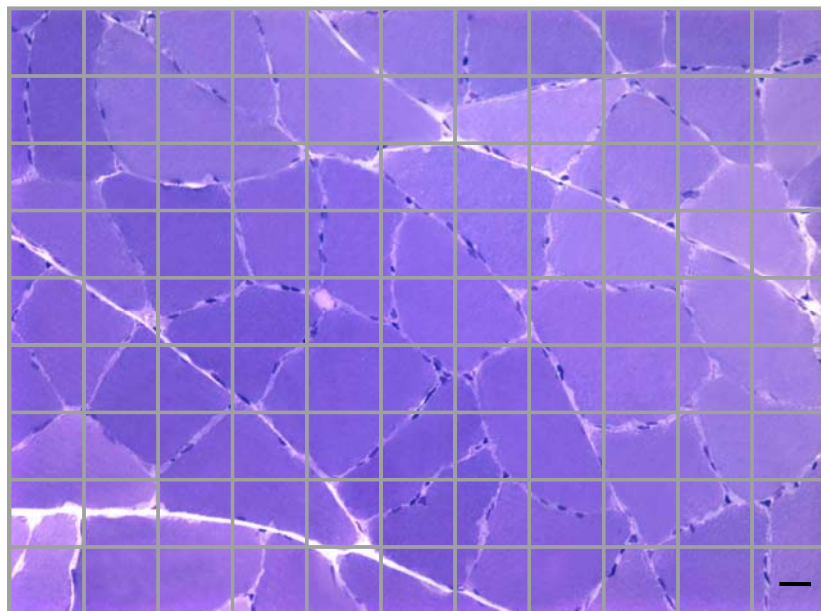


Figura 3. Imagem adaptada da grade do programa *Image Pro Plus*, aplicada sobre campo microscópico, em secção transversal do músculo sóleo de rato Wistar adulto (Coloração: Azul de toluidina-pironina). Barra: 20 μ m.

Uma vez que o miocárdio apresenta suas fibras musculares distribuídas em várias direções, a análise morfométrica foi realizada em campos microscópicos nos quais os cardiomiócitos apareciam seccionados, na sua maioria, em corte transversal. Foram contados 800 pontos por animal, determinando-se a frequência de vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e cardiomiócitos.

3.12. Análise estatística

As médias referentes aos valores da morfometria foram comparadas entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Duncan. Foi utilizado o software STATISTICA for Windows 3.11, sendo o nível de significância de $p > 0,05$. Para a comparação das médias dos níveis de HSP 70 nos músculos sóleo e reto femoral foi utilizado o Teste de Tukey, nível de significância de $p > 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Peso corporal dos animais

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quanto ao peso corporal inicial e final dos ratos sedentários e treinados (Tab. 2). Nakao et al., (2000) trabalhando com um protocolo de 1 hora de natação por dia, 5 dias na semana, por 6 semanas, também não verificaram diferença significativa no peso corporal entre animais sedentários e treinados.

Entretanto, os animais sedentários e treinados ganharam peso, durante o período experimental, sendo que o aumento foi proporcionalmente menor nos animais sedentários. Um maior ganho de peso corporal dos animais treinados, em relação aos sedentários, ainda que não significativo, pode indicar maior desenvolvimento muscular. No estudo de Matsakas et al., (2006), ratos *Wistar* nadaram com aumento progressivo quanto à duração e intensidade do exercício, (60 a 90 minutos diários, com cargas de 3 a 6% do peso corporal), 5 dias por semana, durante 4 semanas. A massa corporal dos animais treinados foi menor em relação aos sedentários, embora, a relação peso do coração/peso corporal tenha sido maior nos animais treinados. Relatou-se uma diminuição do peso corporal relacionada com a redução de gordura, após verificar menor quantidade de gordura intraperitoneal nos animais treinados em relação aos sedentários.

Tabela 2. Peso corporal (média \pm desvio padrão) de ratos *Wistar*, antes e após tratamento com 17 semanas de treinamento em natação.

Animais	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)
Sedentários (n=15)	373,333 \pm 16,33 ^a	458,667 \pm 30,67 ^a	85,333 \pm 20,66 ^a
Treinados (n=14)	380,000 \pm 15,69 ^a	478,571 \pm 31,83 ^a	98,571 \pm 25,38 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan.

4.2. Peso do coração e dos músculos sóleo e reto femoral

O peso do coração e o índice cardiossomático não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os animais sedentários e treinados (Tab. 3). Estes resultados são concordantes com os de Lana (2007), que ao estudar os efeitos do exercício de baixa intensidade, em esteira ergométrica, 5 vezes por semana, durante 12 semanas, não observou aumento no peso do coração dos ratos treinados. Entretanto, Venditti & Di Meo (1996) realizaram um estudo com ratos *Wistar*, utilizando o protocolo de Dawson & Horvaath (1970), para treinamento em natação e teste de exaustão. O treinamento consistiu de uma sessão por dia, 5 vezes na semana, durante 10 semanas. Os autores verificaram aumento significativo no peso do coração, embora os valores para índice cardiossomático não tenham variado significativamente entre ratos treinados e sedentários. Em função desse resultado, os autores especularam que a avaliação da massa cardíaca não é um indicador sensível dos efeitos do treinamento físico para roedores. Nesse mesmo estudo, o tempo médio de natação até a exaustão para o grupo sedentário foi 294 ± 32 minutos e para o grupo treinado 450 ± 35 minutos. Esses valores, estatisticamente significativos, indicaram que um programa de 10 semanas de natação aumentou a capacidade de resistência dos ratos.

No presente trabalho, adaptou-se o protocolo de Dawson & Horvaath (1970), aumentando-se o período de treinamento de 10 para 17 semanas. Apesar disso, não foi verificada diferença significativa no peso do coração e no índice cardiossomático entre ratos sedentários e treinados (Tab. 3). A média do tempo de exaustão, em minutos, também não diferiu estatisticamente entre os animais sedentários ($90,0 \pm 38,48$ min.) e treinados ($125,0 \pm 60$ min.), contrariando os resultados de Venditti & Di Meo (1996). No entanto, o treinamento induziu maior resistência aos animais treinados, os quais, nadaram por mais tempo em comparação com os sedentários (Tab.8).

Os valores médios de peso absoluto e relativo do músculo sóleo não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre ratos sedentários e treinados (Tab. 3).

Entretanto, houve redução significativa do peso absoluto e relativo do músculo reto femoral nos animais treinados ($p < 0,05$).

Tabela 3. Peso do coração, índice cardiossomático e peso absoluto e relativo dos músculos sóleo e reto femoral de ratos *Wistar* sedentários e treinados.

Animais	Peso do coração(mg)	ICS (%)	Peso absoluto RF (g)	Peso absoluto SO (g)	Peso relativo RF (g)	Peso relativo SO (g)
S(n=15)	1657±180 ^a	3,6± 0,0004 ^a	1,19 ± 0,26 ^a	0,22 ± 0,03 ^a	0,003 ± 0,001 ^a	0,0004 ± 0,0 ^a
T(n=14)	1741±164 ^a	0,4 ± 0,0003 ^a	0,96 ± 0,17 ^b	0,23 ± 0,02 ^a	0,002 ± 0,0004 ^b	0,0004 ± 0,0001 ^a

Valores agrupados por média ± desvio padrão. Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan. RF: reto femoral, SO: sóleo, S: sedentário, T: Treinado, ICS: índice cardiossomático.

4.3. Concentração de Lactato sangüíneo

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da concentração de lactato sangüíneo de ratos sedentários e treinados submetidos ao teste clínico de exaustão. No grupo SE houve aumento na concentração de lactato sangüíneo durante o teste de exaustão, que foi maior aos 15 minutos de natação. No final do teste exaustivo, houve tendência à estabilização, porém com valores ainda maiores que no repouso. Já no grupo treinado, observou-se durante o teste um aumento progressivo, mas não significativo, na concentração de lactato sangüíneo.

Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) no tempo médio de exaustão entre os grupos SE (90,0 ± 38,48 min.) e TNE (125,0 ± 60,0 min.), mas, os animais treinados nadaram durante um período maior antes de atingirem a exaustão.

O lactato é um dos melhores indicadores da resposta do organismo ao treinamento físico de *endurance*. A concentração de lactato no sangue é uma

indicação de que o sistema aeróbio não está sendo capaz de suportar a demanda de energia necessária para se completar a atividade. O aumento da concentração de lactato sanguíneo, portanto, pode ser usado como um indicador de exaustão. O lactato aumenta no sangue quando as células musculares estão utilizando o ATP mais rápido do que sua síntese pela mitocôndria (Lamb et al., 2006).

Houve um aumento na concentração de lactato sanguíneo durante o teste de exaustão, tanto nos animais sedentários quanto nos treinados, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de fadiga muscular, como concluído por Lamb et al. (2006). O maior aumento na concentração de lactato sanguíneo aos 15 minutos de natação no grupo SE.

Tabela 4. Concentração de lactato sanguíneo (mmol/L) de ratos *Wistar* sedentários e treinados, submetidos ao teste de exaustão (média \pm desvio padrão).

Grupos	Lacto Repouso (mmol/L)	Lactato 15 min (mmol/L)	Lactato final (mmol/L)	Tempo de exaustão (min)
SE (n=7)	2,86 \pm 0,80 ^a	8,76 \pm 1,59 ^b	7,23 \pm 1,68 ^a	90,0 \pm 38,48 ^a
TNE (n=7)	2,90 \pm 0,40 ^a	5,31 \pm 1,22 ^a	7,17 \pm 3,79 ^a	125,0 \pm 60,0 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan. Grupo SE: sedentário + exaustão; Grupo TNE: treinado + exaustão.

(sedentário) foi devido ao sedentarismo. No entanto, a estabilização no nível de lactato observada no grupo SE, ao final do teste de exaustão, sugere que os animais adaptaram-se ao exercício durante o teste. As reduzidas concentrações de lactato sanguíneo, encontradas nos animais treinados (grupo TNE) durante o teste de exaustão, comparadas com as concentrações dos animais sedentários (grupo SE) são indicativas da eficiência do programa de treinamento usado em melhorar a capacidade aeróbia dos animais, assim como foi verificado no trabalho de Prada et al., (2004). Isso sugere que o treinamento usado no presente estudo alterou a cinética do lactato através de mecanismos de

adaptações aeróbias que, provavelmente, diminuíram a capacidade de produção (Favier et al., 1986; Macrae, 1992) e/ou aumentaram a taxa de remoção de lactato da corrente sanguínea durante o exercício (Donovan & Brooks, 1983; Donovan & Pagliassotti, 1990).

Segundo Papoti et al. (2003), nas fases iniciais do exercício a produção de energia se dá preferencialmente às custas do metabolismo anaeróbio. Nessas fases predominantemente anaeróbias ocorre a formação de lactato, um metabólito muscular que posteriormente é liberado na corrente sanguínea. Apesar de potente correlação entre o lactato sanguíneo e muscular observados durante o exercício, é um erro interpretar o acúmulo de lactato unicamente como reflexo da produção muscular de lactato, pois ainda que em menor quantidade, o intestino, o fígado e a pele são capazes de liberar lactato (Bassan et al., 2006).

Apesar de inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas, sendo que em ratos, são raros os estudos que tratam da cinética de lactato durante o exercício (Voltarelli et al., 2004). A natação até a exaustão eleva a concentração de lactato sanguíneo, tanto nos animais sedentários quanto nos treinados, e a evolução no condicionamento aeróbio, em função do treinamento físico, pode ser um dos fatores responsáveis pela adaptação à produção e acúmulo do lactato sanguíneo.

4.4. Distribuição (%) de fibras dos tipos I e II nos músculos sóleo e reto femoral.

Através da reação Succino Desidrogenase (SDH), as fibras musculares do tipo I, em virtude da grande quantidade de mitocôndrias, se coram intensamente em azul marinho, enquanto as fibras do tipo II apresentam uma reação nitidamente mais fraca. Fibras do tipo I são frequentemente menores em comparação com as do tipo II (Fig. 4 e 5).

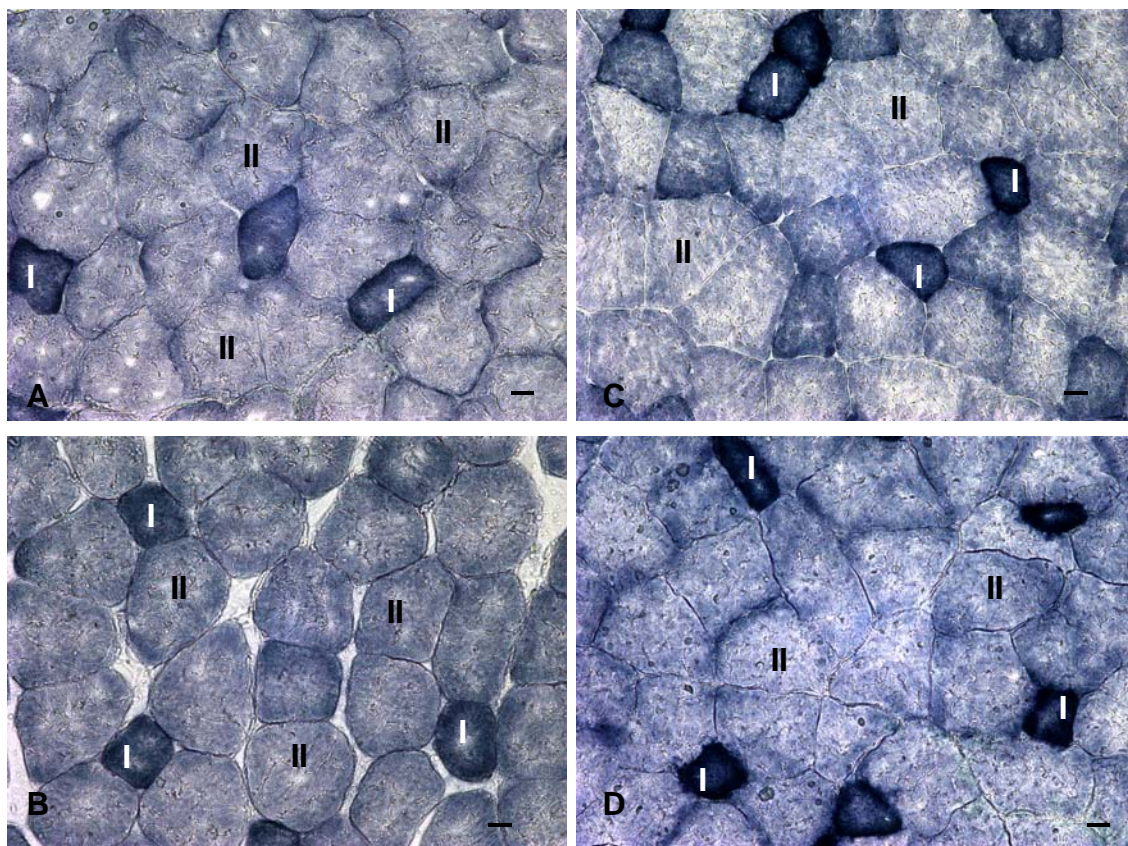


Figura 4. Secções histológicas de fibras do músculo sóleo de ratos *Wistar*, em corte transversal, após a reação para Succino Desidrogenase (SDH). A: Controle sedentário; B: Sedentário + exaustão; C: Treinado; D: Treinado + exaustão. I: Fibra do tipo I; II: Fibra do tipo II. Barra: 20 μ m.

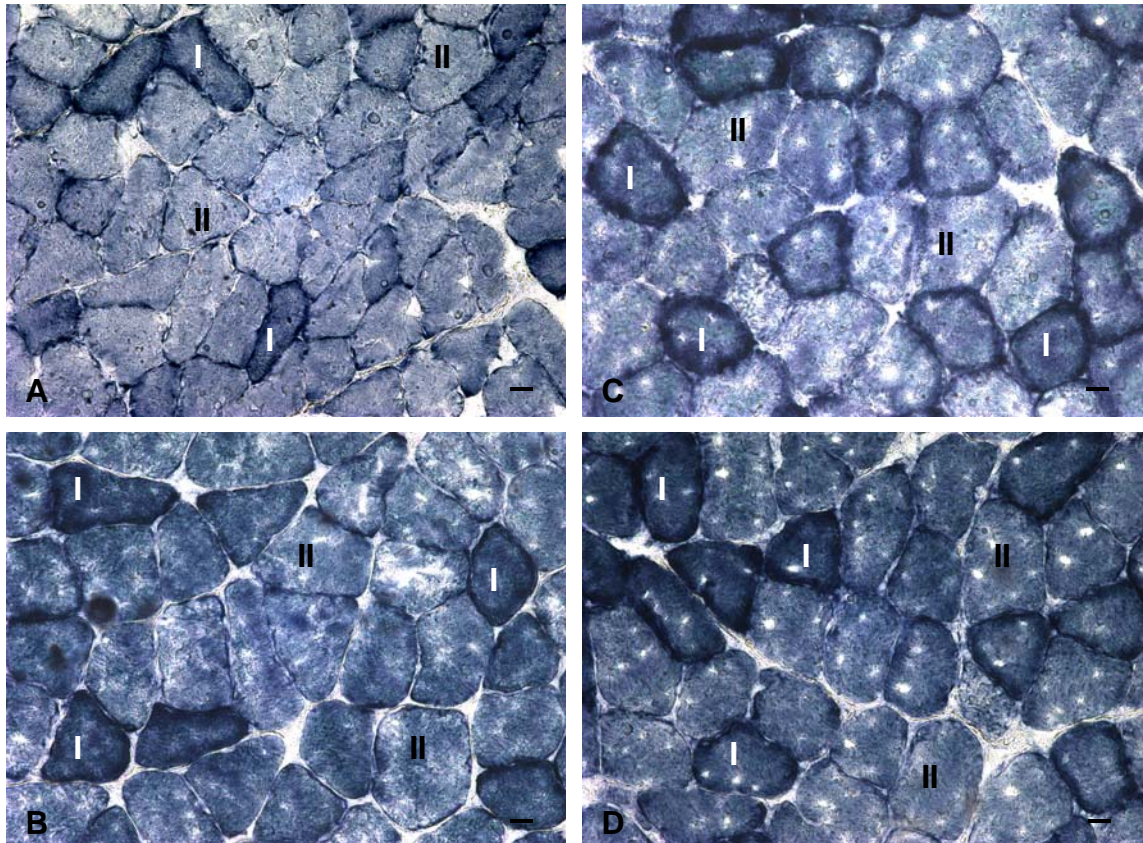


Figura 5. Secções histológicas de fibras do músculo reto femoral de ratos *Wistar*, em corte transversal, após reação para Succino Desidrogenase (SDH). A: Controle sedentário; B: Sedentário + exaustão; C: Treinado; D: Treinado + exaustão. I: Fibra tipo I; II: Fibra tipo II. Barra: 20 μ m.

Foi observada redução ($p < 0,05$) na percentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo dos animais treinados em relação aos sedentários. A percentagem de fibras dos tipos I e II no reto femoral não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre sedentários e treinados (Tab. 5).

Tabela 5. Distribuição (%) de fibras dos tipos I e II nos músculos sóleo (SO) e reto femoral (RF) de ratos *Wistar* após tratamento com 17 semanas de treinamento em natação e reação para succino-desidrogenase (SDH).

Animais	SO I (%)	SO II (%)	RF I (%)	RF II (%)
Sedentários (n=15)	57,695 ± 13,80 ^b	42,305 ± 16,10 ^a	17,081 ± 10,41 ^a	82,919 ± 10,41 ^a
Treinados (n=14)	45,426 ± 8,79 ^a	54,574 ± 8,82 ^a	17,009 ± 12,64 ^a	82,608 ± 12,64 ^a

Valores agrupados por média ± desvio padrão; Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan.

Os resultados obtidos para a percentagem de fibras no músculo sóleo são contrários à maioria dos estudos relatados na literatura. Segundo Pette & Staron (1997), é bem documentado que o treinamento com alta demanda metabólica aumentará a capacidade oxidativa dos músculos recrutados, havendo conversão do tipo lib para IIa. Aliás, o treinamento intenso pode promover, ainda, a transformação de fibras do tipo II para I. A maioria dos relatos na literatura indica que alterações no padrão bioquímico das fibras ocorrem também nas atividades de força ou velocidade (Morales-Lopes et al., 1990). Entretanto, resultados contraditórios, indicam aumento das fibras glicolíticas, após o treinamento de força ou velocidade (Pette & Staron, 1997; Silva & Minamoto, 2005). Misumi et al., (1995) treinaram cavalos em corrida e em natação. Após cinco meses, os autores observaram aumento das fibras tipo lib e diminuição do tipo IIa nos grupos que associaram o treinamento de corrida com o de natação.

No estudo realizado por Saad et al., (2002) foi observado aumento significativo da capacidade oxidativa (aumento no percentual de fibras dos tipos I e IIa) no músculo intercostal paraesternal dos ratos que nadaram 30, 45 e 60 dias, e aumento de fibras do tipo I apenas nos ratos que nadaram 60 dias. Paralelamente, houve diminuição significativa das fibras do tipo lib do músculo intercostal paraesternal nos ratos que nadaram durante 30, 45 e 60 dias, o que

indica a possível conversão de fibras relatada por McArdle et al., (1998), embora essa conversão seja contestada por Foss & Keteyian (2000). A percentagem de fibras do tipo IIb no músculo intercostal paraesternal, a partir de 30 dias de natação, apresentou relação inversamente proporcional à duração da atividade, ou seja, quanto maior o número de dias de atividade, menor o valor percentual das mesmas, sendo tal decréscimo coincidente com o aumento das fibras dos tipos I e IIa, o que contribui para maior resistência à fadiga.

Viru (1994) estudou os diferentes efeitos de vários regimes de treinamento sobre o metabolismo dos músculos sóleo e quadríceps (porção branca) de ratos *Wistar*. Modelos de *sprint*, corrida contínua aeróbia ou intervalada, foram realizados por dez semanas e os treinamentos de força e natação por seis semanas. Verificou-se que a atividade da ATPase miofibrilar aumentou após o treinamento de *sprint*, corrida e força, mas diminuiu com a natação (Hickson et al., 1975).

4.5. Área das fibras dos tipos I e II nos músculos sóleo e reto femoral.

A área das fibras dos tipos I e II em corte transversal, no músculo sóleo, não apresentou aumento significativo ($p > 0,05$) nos animais treinados em relação aos sedentários (Tab. 6). O mesmo foi observado no músculo reto femoral (Tab. 7).

Tabela 6. Área de secção transversa das fibras dos tipos I e II do músculo sóleo de ratos *Wistar*, após tratamento com 17 semanas de treinamento em natação. (Média \pm desvio padrão).

Animais	Fibra I (μm^2)	Fibra II (μm^2)
Sedentários (n=15)	6.206,41 \pm 1.712,4 ^a	6.674,062 \pm 1.552,68 ^a
Treinados (n=14)	6.601,5 \pm 2013,0 ^a	7.462,235 \pm 2224,36 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan.

Tabela 7. Área de secção transversa das fibras dos tipos I e II do músculo reto femoral de ratos *Wistar*, após tratamento com 17 semanas de treinamento em natação (média \pm desvio padrão).

Animais	Fibra I (μm^2)	Fibra II (μm)
Sedentários (n=15)	3.561,16 \pm 911,16 ^a	9.219,42 \pm 1.558,77 ^a
Treinados (n=14)	4.074,87 \pm 1193,27 ^a	9.844,894 \pm 3948,86 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan.

As adaptações induzidas pela natação não foram suficientes para desenvolver hipertrofia, tanto no sóleo quanto no reto femoral. Resultado semelhante foi verificado por Camargo et al., (2006). Neste estudo, ratos *Wistar* nadaram 1 hora/dia, 5 dias/semana, suportando sobrecarga equivalente ao limiar anaeróbio. Após o treinamento procedeu-se a análise dos teores de proteína total e DNA no músculo sóleo, para inferir sobre os efeitos do treinamento sobre o tamanho e o número de células nesse músculo. Não foram constatadas diferenças significativas nesses parâmetros entre os grupos treinado e sedentário, em ambas as séries de experimentos do referido estudo, permitindo inferir que não houve hipertrofia após o treinamento. Silva & Minamoto, (2006) avaliaram a área dos diferentes tipos de fibras do sóleo de ratos após treinamento em natação. A análise das fibras foi realizada utilizando-se cortes submetidos à reação para ATPase em pH 4.3 e 10.3. Os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração significativa entre os grupos experimentais.

Em estudos prévios, utilizando-se treinamento por meio de corrida, durante 8 e 10 semanas, também não foi observado aumento na área de secção transversa de fibras dos músculos sóleo e plantar (Ishihara et al., 1998; Demirel et al., 1999). Assim, sugere-se que a não alteração da área das fibras do sóleo e do reto femoral, como observado no presente estudo, não está

relacionada apenas ao tipo de exercício utilizado (natação), uma vez que a corrida também não foi eficiente em promover hipertrofia muscular.

Segundo Jasson & Kaijser (1997), o treinamento aeróbio crônico pode diminuir a área de secção transversa das fibras musculares. Acredita-se que a atrofia de fibras musculares em resposta ao exercício aeróbio ocorre para encurtar a distância de difusão do oxigênio a todas as partes do músculo durante o exercício. Neste sentido, verificou-se que um programa de natação com 80 minutos/dia, 5 dia/semana durante 13 semanas provocou diminuição na área das fibras da porção torácica do músculo diafragma de hamsters adultos (Reid et al., 1997).

Deve-se considerar que principalmente o músculo reto femoral apresenta variações regionais para suas características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, o que interfere nos resultados dos estudos. Além disso, soma-se a possível diferença individual entre os animais estudados. A interconversão dos tipos bioquímicos de fibras e a determinação das proporções de fibras dos tipos I e II são aspectos conhecidos, (Ciabattari et al., 2005), embora, existam controvérsias devido aos diferentes métodos de análise quantitativa e qualitativa ou até mesmo pelo tipo de reação histoquímica utilizada na identificação dos tipos de fibras.

4.6. Proporções volumétricas dos componentes do miocárdio

A estrutura histológica do miocárdio se manteve inalterada nos animais treinados e sedentários (Fig. 6), verificando que não houve diferença significativa na proporção de cardiomiócitos (Tab. 8).

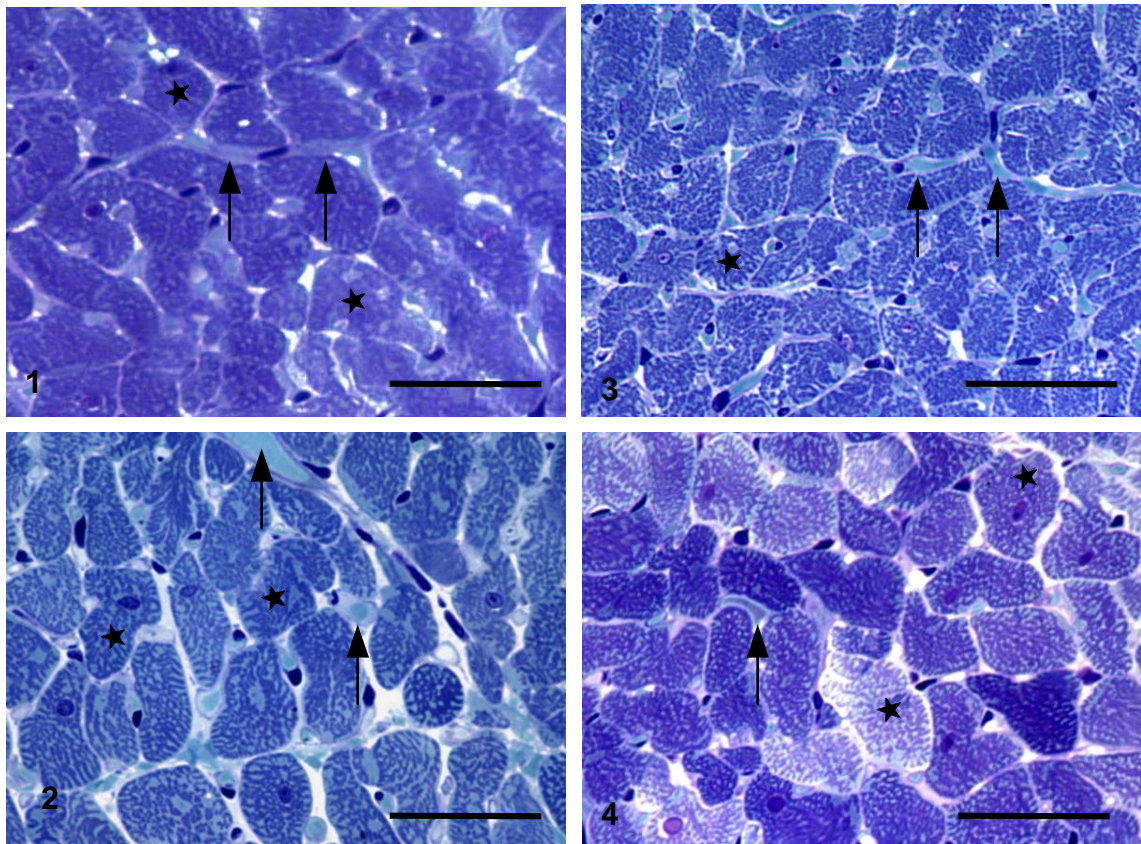


Figura 6. Secções histológicas de miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos *Wistar*. **1:** Controle sedentário; **2:** Sedentário + exaustão; **3:** Treinado; **4:** Treinado + exaustão. Estrela: fibra muscular; Seta: vaso sanguíneo. Barra: 20 μm .

Na Tabela 8, pode-se observar leve aumento não significativo da vascularização no miocárdio dos animais treinados em relação aos sedentários. O maior valor observado para a proporção volumétrica de tecido conjuntivo foi registrado nos animais sedentários ($92,7 \pm 27,89$).

Tabela 8. Proporção volumétrica dos componentes do miocárdio de ratos *Wistar*, após tratamento com treinamento em natação. (Média \pm desvio padrão)

Animais	Cardiomiócitos	Vasos sanguíneos	Tecido conjuntivo
Sedentários (n=15)	482,9 \pm 28 ^a	224,4 \pm 35,50 ^a	92,7 \pm 27,89 ^a
Treinados (n=14)	480,9 \pm 48 ^a	241,714 \pm 37,70 ^a	77,386 \pm 9,70 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan.

Sabe-se que o treinamento físico conduz ao melhor desempenho cardiovascular o qual está associado com aumentos no peso e no volume ventricular além da hipertrofia de fibras musculares (Evangelista et al., 2003). A natação crônica é reconhecida por sua eficiência em induzir hipertrofia no miocárdio (Adavani et al., 1990; Medeiros et al., 2004) e parece ser um tipo de treinamento aeróbio eficiente para provocar adaptações benéficas ao sistema cardiovascular (Medeiros et al., 2000). Segundo a *American Physiological Society* (2006), um programa de natação pode ser otimizado para produzir hipertrofia cardíaca máxima utilizando-se 90 minutos por dia, duas vezes por dia, 5 dias na semana por 4 semanas sem nenhum peso adicionado ao animal. Embora não tenha sido realizada a medida de área dos cardiomiócitos, utilizou-se no presente estudo, o índice cardiossômático. Não houve diferença estatística significativa para esse parâmetro, o que sugere que o protocolo de natação utilizado não provocou hipertrofia cardíaca. Contrariando alguns estudos anteriormente citados, as proporções volumétricas de fibras musculares, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo do miocárdio não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os animais sedentários e treinados após dezessete semanas de natação. Segundo Evangelista et al. (2003), a adaptação cardíaca ao treinamento físico é dependente de fatores tais como a sobrecarga, a duração e a frequência do exercício. No presente estudo,

as adaptações ocorridas no coração dos animais treinados foram insuficientes para diferirem dos animais sedentários.

4.7. Análise histológica dos músculos sóleo e reto femoral

A avaliação histológica do músculo reto femoral dos animais do grupo CS, mostrou predominância de fibras musculares com morfologia preservada, de aspecto poligonal em corte transversal, individualmente envolvidas pelo endomísio e organizadas em fascículos pelo perimísio (Fig. 7).

Na Tabela 9 observa-se que a frequência de lesões no músculo reto femoral do grupo TN ($24,0 \pm 12,86$) não diferiu estatisticamente do grupo CS ($p > 0,05$). A frequência de fibras lesadas no músculo reto femoral dos grupos SE e TNE foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CS. Os animais do grupo TNE apresentaram as maiores médias de frequência de miofibras lesadas ($39,57 \pm 17,56$), embora não diferindo estatisticamente do grupo SE ($37,57 \pm 17,94$). Estes resultados indicam que o exercício exaustivo induziu lesões no músculo reto femoral de indivíduos sedentários e treinados.

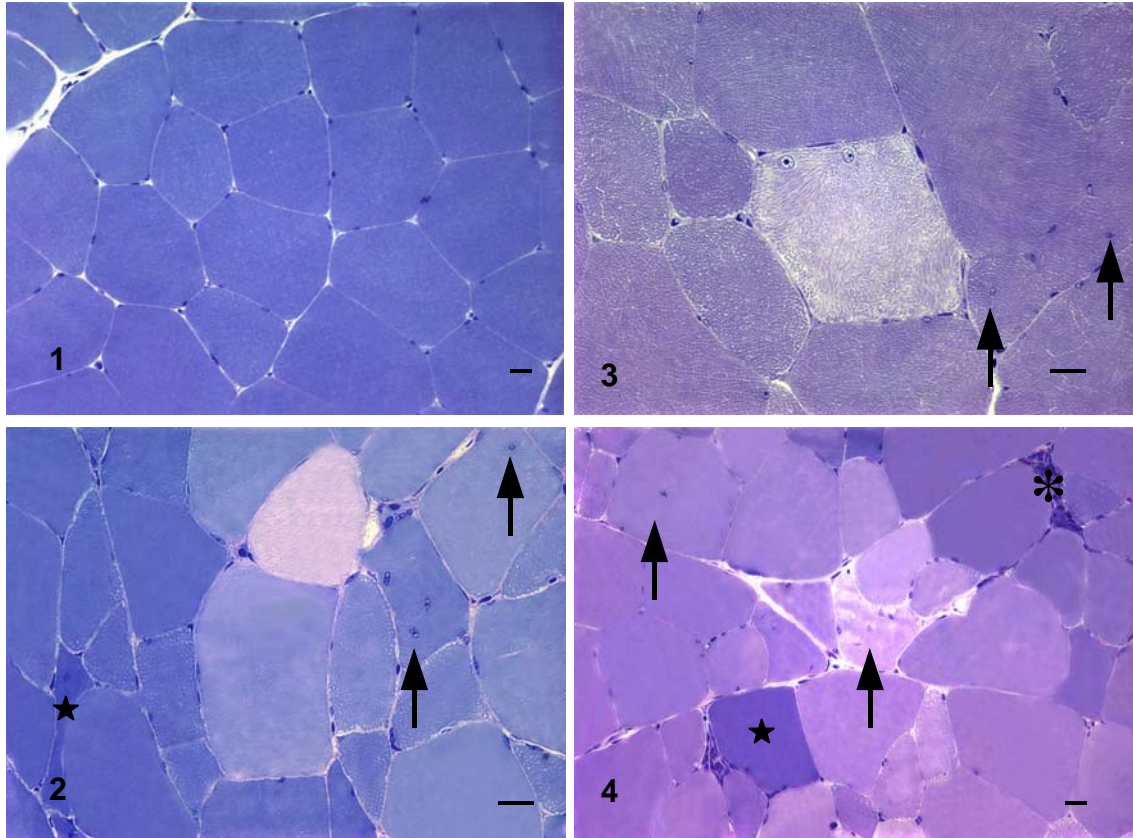


Figura 7. Fibras do músculo reto femoral de ratos *Wistar*, em corte transversal. 1: Controle sedentário; 2: Sedentário + exaustão; 3: Treinado; 4: Treinado + exaustão. Asterísco: infiltrado inflamatório; Seta: núcleos deslocados para o centro da fibra muscular; Estrela: fibras com citoplasma intensamente corado. Barra: 20 μm .

Tabela 9. Frequência de fibras lesadas, vasos sanguíneos, mastócitos e infiltrado inflamatório intersticial no reto femoral (RF) de ratos *Wistar* sedentários e treinados. (Média \pm desvio padrão).

Grupos	Fibras lesadas	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Infiltrado inflamatório intersticial
CS (n=8)	16,75 \pm 10,70 ^b	63,87 \pm 56,13 ^{ab}	0,875 \pm 1,13 ^a	0 \pm 0 ^a
SE (n=7)	37,57 \pm 17,94 ^a	54,29 \pm 41,24 ^b	2,0 \pm 1,29 ^a	0 \pm 0 ^a
TN (n=7)	24,0 \pm 12,86 ^{ab}	54 \pm 18,12 ^b	3,29 \pm 3,73 ^a	0 \pm 0 ^a
TNE (n=7)	39,57 \pm 17,56 ^a	99,14 \pm 12,56 ^a	2,29 \pm 2,69 ^a	0,14 \pm 0,38 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan. Grupo CS: controle sedentário; Grupo SE: sedentário + exaustão; Grupo TN: Treinado; Grupo TNE: treinado + exaustão.

As alterações estruturais observadas no músculo sóleo (Fig. 8) foram semelhantes às verificadas no reto femoral (Fig. 7). Os animais do grupo TNE também apresentaram as maiores médias ($p < 0,05$) de fibras lesadas (61,57 \pm 21,68) seguidas pelo grupo SE (34,86 \pm 11,45). A frequência de fibras lesadas no músculo sóleo dos grupos SE e TNE foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CS (Tab. 10).

Após a exaustão, o grupo TNE mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) de vasos sanguíneos (99,14 \pm 12,56) no músculo reto femoral em relação aos grupos SE e TN (Tab. 9). No músculo sóleo, também o grupo TNE apresentou um aumento significativo na frequência de vasos sanguíneos em relação aos grupos CS e SE (Tab. 10).

Leves infiltrados inflamatórios em fibras do músculo reto femoral foram encontrados apenas no grupo TNE (Fig. 7.4). Os focos inflamatórios foram observados principalmente no interstício dos músculos sóleo e reto femoral. Os infiltrados inflamatórios foram mais frequentes nos treinados TN e TNE, mas não houve aumento significativo ($p > 0,05$) em relação ao grupo CS (Tab. 10). A

freqüência de mastócitos nos músculos sóleo e reto femoral não variou estatisticamente ($p>0,05$).

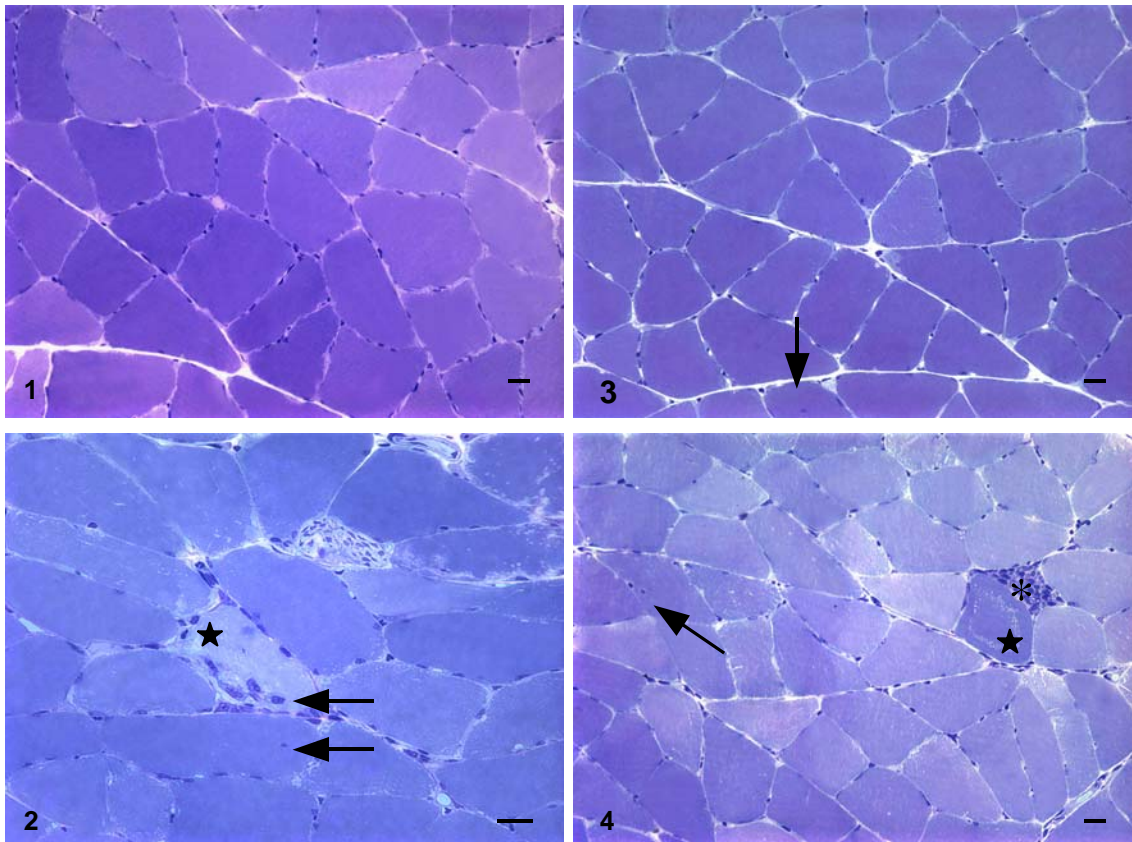


Figura 8. Fibras do músculo sóleo de ratos *Wistar*, em corte transversal. 1: Controle sedentário; 2: Sedentário + exaustão; 3: Treinado; 4: Treinado + exaustão. Asterísco: infiltrado inflamatório; Seta: núcleos deslocados para o centro da fibra muscular. Estrela: fibras musculares com vacuolização citoplasmática . Barra: 20 μ m.

Os resultados indicam que nos animais deste estudo, os músculos sóleo e reto femoral foram ativos durante a natação. A presença de fibras com alterações indica uma possível agressão ao músculo e tentativa de regeneração. As fibras que sofrem necrose recente aparecem mais claras e com aspecto homogêneo, possivelmente devido à menor quantidade de miofibrilas. As fibras em regeneração têm diâmetro menor, e são mais

intensamente coradas, devido à alta concentração de ribossomos e pobreza de miofibrilas; os núcleos tendem a ser mais volumosos e localizados no interior da fibra muscular como referido por Duarte et al. (2001).

Tabela 10. Frequência de componentes intramusculares no sóleo (SO) de ratos *Wistar* sedentários e treinados. (Média \pm desvio padrão).

Tratamentos	Fibras lesadas	Vasos sanguíneos	Mastócitos	Inf. inflamatório intersticial
Grupo CS (n=8)	13,88 \pm 10,75 ^c	157,25 \pm 47,91 ^b	5,25 \pm 2,25 ^a	0,125 \pm 0,35 ^a
Grupo SE (n=7)	34,86 \pm 11,45 ^b	148,29 \pm 53,50 ^b	4,71 \pm 3,82 ^a	0,29 \pm 0,49 ^a
Grupo TN (n=7)	24,14 \pm 16,17 ^{bc}	200,71 \pm 27,35 ^{ab}	6,71 \pm 3,45 ^a	0,43 \pm 0,79 ^a
Grupo TNE (n=7)	61,57 \pm 21,68 ^a	239,71 \pm 62,97 ^a	7,0 \pm 6,22 ^a	0,43 \pm 0,79 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Duncan. Grupo CS: controle sedentário; Grupo SE: sedentário + exaustão; Grupo TN: Treinado; Grupo TNE: treinado + exaustão.

As lesões evidenciadas nos músculos sóleo e reto femoral indicam que tais músculos foram ativos durante o treinamento e são contrárias aos resultados encontrados por Roy et al., (1991) e Laughlin et al., (1984). Laughlin et al., (1984) encontraram um fluxo sanguíneo significativamente maior nos músculos extensores do tornozelo, com exceção do sóleo e da porção branca do gastrocnêmio, e nos músculos extensores do joelho, com exceção da porção branca do vasto lateral e do reto femoral, indicando que os músculos sóleo e reto femoral são pouco ativos durante a natação. Roy et al., (1991) estudaram os padrões eletromiográficos de músculos extensores e flexores do joelho de ratos submetidos à locomoção, durante os exercícios em esteira e natação. Segundo estes autores, a natação parece ser uma atividade que impõe menor carga sobre os músculos antigravitacionais (predominância de fibras oxidativas) como o sóleo, quando comparados com os gravitacionais como o tibial anterior.

Segundo Clebis & Natali (2001), após exercícios físicos é possível identificar lesões no músculo esquelético. O grau de lesão muscular depende da duração e intensidade do exercício. Dentre as lesões, destacam-se o desarranjo e rompimento da estrutura de miofilamentos, de linhas Z, de sarcômeros, desorganização das organelas, rompimento do sarcolema, atividade lisossomal acentuada, e infiltração de células mononucleadas, principalmente macrófagos (Armstrong, 1990; Clebis & Natali, 2001).

Deve-se levar em consideração que, durante a fase experimental desta pesquisa, os animais submetidos ao treinamento em natação adotaram a prática de saltos com grande frequência. Diante da Iminência de fadiga os ratos nadavam até o fundo do tanque e a partir de um impulso vigoroso realizavam movimentos rápidos de flexão e extensão dos membros posteriores. Com isso os músculos dos membros anteriores trabalharam continuamente na natação, enquanto nos membros posteriores os músculos exerceram maior trabalho total, pois realizaram saltos intercalados com a natação. Essa prática de saltos durante o período de 17 semanas de treinamento sugere a ocorrência de uma ação mais efetiva dos músculos sóleo e reto femoral durante o treinamento o que poderia contribuir para a ocorrência de lesões nos referidos músculos ao se considerar a pequena ação de tais músculos durante a natação, referida por Laughlin et al. (1984) e Roy et al., (1991). No entanto, verificou-se neste trabalho, que as lesões musculares foram mais frequentes nos animais submetidos ao exercício exaustivo.

No exercício físico intenso há um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio do organismo e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular. Esse tipo de exercício pode ativar diferentes vias de formação de espécies reativas de oxigênio e desencadear lesões musculares (Koury & Donangelo, 2003; Schneider & Oliveira, 2004).

Quanto à frequência de vasos sanguíneos nos músculos sóleo e reto femoral, os resultados deste trabalho são concordantes com alguns autores. Adolfsson et al., (1981) demonstraram que ratos treinados em natação, uma hora por dia, cinco dias na semana durante um período de três semanas

aumentaram significativamente a densidade capilar do músculo quadríceps femoral. Este aumento foi proporcionalmente maior nos animais jovens, com peso corporal inicial de 100g, do que em ratos adultos com peso inicial de 200g. Entretanto, Efthimiadou et al., (2006) ao estudar o efeito da administração intramuscular do fator de crescimento de fibroblasto-básico (b-FGF) e da natação, verificaram aumento significativo do número de vasos sanguíneos no músculo gastrocnêmio dos animais do grupo tratado com doses de 1µl de b-FGF a cada três dias, durante um período de 15 dias. Um grupo de animais exercitados recebeu as mesmas doses de b-FGF do grupo anterior além da prática de natação uma vez por dia, durante 15 dias, e os animais apresentaram aumento significativo da neovascularização em relação aos animais do grupo controle sedentário sem tratamento. Um terceiro grupo realizou apenas a natação diária por 15 dias e apresentou redução significativa do número de vasos sanguíneos no gastrocnêmio. Segundo Efthimiadou et al., (2006), a natação parece diminuir a vascularização no músculo gastrocnêmio comparado com o grupo controle, provavelmente como resultado de mudanças com aumento da massa muscular (hipertrofia).

O exercício físico e a contração muscular constituem num poderoso estímulo para a remodelação estrutural vascular. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente mitógeno de células endoteliais implicadas na angiogênese em resposta ao exercício (Prior et al., 2004). Segundo Bloor (2005) a densidade capilar no músculo esquelético é significativamente aumentada pelo treinamento com exercício aeróbio, embora, alguns programas de treinamento de resistência possam resultar em hipertrofia de fibras musculares com aumento da área das fibras e uma aparente diminuição dos capilares. A aparente diminuição de vasos sanguíneos seria resultado do ganho proporcionalmente maior de massa muscular em relação ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, como foi referido também por Efthimiadou et al. (2006).

4.8. Apoptose nos músculos sóleo e reto femoral

Na reação de TUNEL, os núcleos apoptóticos se caracterizam por uma coloração marrom acentuada (Fig. 9C). Porém, a marcação de apoptose foi nitidamente escassa nos músculos sóleo e reto femoral de ratos treinados e/ou submetidos ao teste exaustivo.

Podhorska-Okolow et al., (1998) verificaram aumento na frequência de núcleos apoptóticos no músculo tibial anterior de ratos adultos, jovens e saudáveis após uma noite de exercício agudo por meio de corrida espontânea em roda ($4 \pm 3.5\%$ imediatamente ao final do exercício e $2,5 \pm 1,8\%$ seis horas após o exercício). Quatro dias depois do exercício os núcleos apoptóticos diminuíram, mas ainda foram encontrados no músculo ($0,8 \pm 1,5\%$). Os autores identificaram também células satélites e células endoteliais em apoptose nos músculos dos animais submetidos ao exercício agudo. Siu et al., (2004) verificaram que o treinamento prolongado diminuiu a apoptose. Os autores demonstraram que 8 semanas de treinamento aeróbio moderado, por meio de corrida em esteira, atenuou a apoptose no músculo sóleo e no miocárdio de ratos adultos. Houve diminuição das caspases relacionadas à apoptose e um aumento na expressão de Mn-SOD (superóxido dismutase dependente do manganês) e de HSP70, ambas apresentando um papel anti-apoptótico nas miofibras. Em outro experimento, Siu et al., (2005) trabalharam com a hipótese de que supressores apoptóticos estariam envolvidos com os efeitos anti-apoptóticos induzidos pelo exercício aeróbio. Após 8 semanas de corrida esteira, os músculos sóleo e miocárdio apresentaram um aumento na expressão de supressores apoptóticos endógenos (XIAP e ARC) sugerindo que estes e outros mecanismos anti-apoptóticos, ainda desconhecidos, poderiam ser desencadeados pelas adaptações das fibras musculares ao exercício aeróbio prolongado. Segundo Phaneuf & Leeuwenburgh (2001), os mecanismos pelos quais a apoptose é induzida em músculos esqueléticos adultos após o exercício físico ainda são desconhecidos. Uma das hipóteses é que durante o exercício, ocorre um aumento no metabolismo muscular e na produção de espécies

reativas de oxigênio. Altas quantidades de oxidantes podem produzir dano ao DNA e desencadear diretamente a apoptose, especialmente nas fibras do tipo I (predominantemente oxidativas). Além disto, o estresse do exercício físico pode elevar os níveis de outros indutores de apoptose como glicocorticóides e catecolaminas.

Previamente na revisão de literatura foram destacados os mecanismos desencadeadores de apoptose, até então conhecidos. Duas das vias intrínsecas de sinalização podem ser inibidas pela ação da HSP 70, a qual pode se ligar ao Apaf-1, no apoptossoma, inibindo uma via de apoptose dependente de caspases. Ao se ligar ao AIF, a HSP 70 pode impedir sua translocação para o núcleo, impedindo a apoptose da via independente de caspases. É sabido que a HSP 72, uma isoforma da HSP 70 (Welch, 1992), é sintetizada após exercício físico em músculos esqueléticos (Skidmore, 1995; Smolka et al., 2000). No entanto, a ocorrência escassa de mionúcleos apoptóticos nos músculo sóleo e reto femoral, verificada neste trabalho, parece ter sofrido pouca influência dos efeitos anti-apoptóticos das HSP.

Considerando que a apoptose, no músculo esquelético, ocorre por um mecanismo altamente regulado, que pode sofrer diversas influências, é necessário melhor entendimento das vias envolvidas na apoptose, e dos mecanismos desencadeados no músculo esquelético perante a prática de exercício físico, sobretudo a natação. Só a realização de novas pesquisas poderão esclarecer se a natação exerce estímulos menos lesivos que outras modalidades de exercício agudo e aeróbio, ou ainda, se as condições do protocolo realizado nesse trabalho não foram suficientes para desencadear adaptações associadas aos mecanismos de apoptose nas fibras dos músculos esqueléticos estudados.

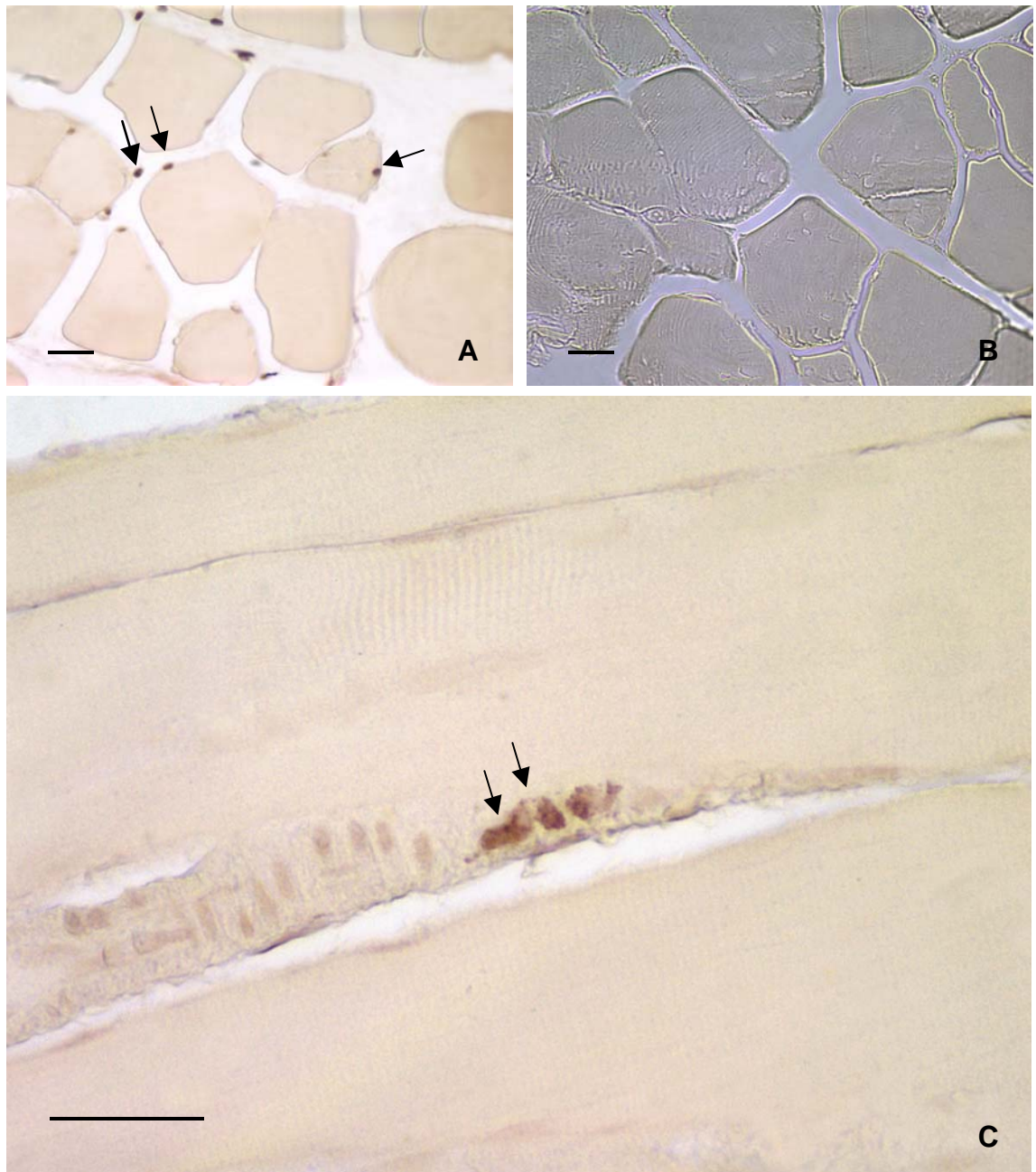


Figura 9. Secções histológicas do músculo reto femoral de ratos *Wistar* (reação de TUNEL). A. Animal do grupo CS, controle positivo. B. Animal do grupo CS, controle negativo. C. Animal do grupo TNE. Seta: núcleos positivos para a reação têm coloração marrom acentuada. Barra: 20 μ m.

4.9. HSP 70

Analisando-se o conteúdo de HSP 70 (isoformas HSP 72 e 73) nos músculos sóleo e reto femoral não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os animais (Tab. 11).

Observou-se aumento não significativo ($p > 0,05$) de HSP 70 nos animais dos grupos tratados com exercício de exaustão em natação (grupos SE e TNE) em relação aos grupos controle sedentário e controle treinado, tanto no músculo sóleo quanto no reto femoral (Tab. 11).



Figura 9. Acúmulo de proteína de choque térmico (HSP 70) no músculo reto femoral de ratos. As mesmas quantidades de proteínas do reto femoral de ratos foram separadas por SDS-PAGE e o immunoblotting foi feito com anticorpo monoclonal HSP 70. CS: controle sedentário; SE: sedentário + exaustão; TN: treinado; TN E: treinado + exaustão.

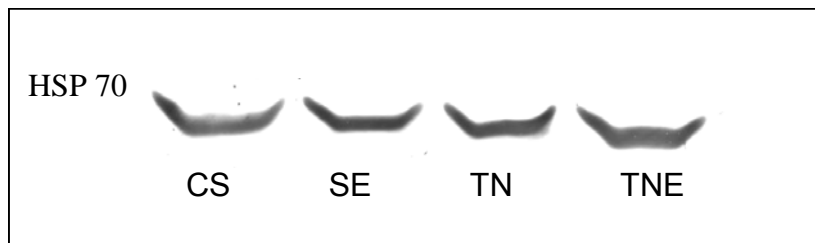


Figura 10. Acúmulo de proteína de choque térmico (HSP 70) no músculo sóleo de ratos. As mesmas quantidades de proteínas do sóleo de ratos foram separadas por SDS-PAGE e o immunoblotting foi feito com anticorpo monoclonal HSP 70. CS: controle sedentário; SE: sedentário + exaustão; TN: treinado; TN E: treinado + exaustão.

Tabela 11. Expressão de HSP 70 (HSP 72 e 73) nos músculos sóleo (SO) e reto femoral (RF) de ratos *Wistar* sedentários e treinados, submetidos ou não ao teste exaustivo. (Média \pm desvio padrão).

Tratamentos	HSP 70 SO	HSP 70 RF
Grupo CS (n=6)	5,59 \pm 1,75 ^a	5,16 \pm 1,90 ^a
Grupo SE (n=6)	6,29 \pm 0,98 ^a	5,37 \pm 2,08 ^a
Grupo TN (n=3)	5,49 \pm 1,12 ^a	5,66 \pm 4,90 ^a
Grupo TNE (n=6)	6,46 \pm 1,36 ^a	6,75 \pm 2,72 ^a

Médias, nas colunas seguidas com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste Tukey. Grupo CS: controle sedentário; Grupo SE: sedentário + exaustão; Grupo TN: Treinado; Grupo TNE: treinado + exaustão.

O estresse provocado pelo exercício, agudo e crônico, tem sido identificado como potencial indutor da expressão de HSP 70 no músculo esquelético de várias espécies animais. O aumento da expressão de HSP induzido pelo exercício físico em roedores é muito estudado (Morton, 2006). O aumento de HSP no músculo esquelético após exercício é capaz de restaurar a homeostase, promover a remodelação celular, e fornecer citoproteção contra os repetidos insultos celulares ocorridos durante a atividade física (McArdle & Jackson, *apud* Morton, 2006).

No presente trabalho, detectou-se a expressão de HSP 70 nos músculos sóleo e reto femoral dos animais sedentários e treinados em natação, submetidos ou não ao teste de exaustão. Não foi observada diferença significativa entre os grupos CS, SE, TN, TNE. No entanto, verificou-se um leve aumento de HSP 70 nos animais submetidos à natação até exaustão (grupos SE e TNE) comparados aos grupos CS e TN. A HSP 72 é expressa exclusivamente por eventos de estresse (Snoeckx et al., 2001) sendo altamente induzida pelo exercício físico em músculo esquelético e cardíaco (Skidmore et al., 1995), enquanto a HSP 73 é constitutiva (Kiang & Tsokos, 1998). Assim, os

diferentes valores de HSP 70 encontrados entre os grupos representa a expressão de HSP 72 nos músculos sóleo e reto femoral respectivamente (Tab. 11). Esses resultados diferem da maioria dos estudos encontrados atualmente na literatura. Atalay et al. (2004), analisaram o efeito de um programa de treinamento com corrida forçada em esteira rolante, durante o período de 8 semanas, sobre a expressão de HSP 72 no músculo esquelético, coração e fígado de ratos. Os resultados mostraram que o treinamento aumentou significativamente a expressão de HSP 72 em todos os tecidos examinados. Sugere-se, que a HSP 72 faça parte de um sistema secundário de defesa atuando para fornecer uma rápida proteção adicional quando o principal sistema de proteção (a atividade enzimática antioxidante) é atacado pelo estresse induzido pelo exercício (Lepore et al., 2000; Smolka et al., 2000).

Em relação aos diferentes músculos, Oshi et al. (2002) observaram que a síntese de HSP 72 foi mais rápida no músculo sóleo do que no músculo plantar, sugerindo que músculos predominantemente oxidativos (ricos em fibras tipo I) podem ser mais responsivos às condições muito estressantes quando comparados aos músculos dotados de metabolismo glicolítico. Esta resposta diferencial poderia estar relacionada com o fato de músculos com fibras do tipo I terem alta taxa de renovação, quando comparados aos músculos com mais fibras do tipo II (Neufer et al., 1996). Além disso, as fibras do tipo I têm níveis mais altos de HSP 72 que as fibras do tipo II (González et al., 2000), e o sóleo pode ter uma habilidade inata para sintetizar HSP 72 mais rapidamente que os músculos do tipo II sob as mesmas condições de estresse (Oshi et al., 2002). Neste sentido, Hernando & Manso (1997) estudaram o estresse sobre as fibras dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos *Wistar* em resposta a corrida em esteira motorizada. Os animais foram sacrificados nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a corrida. A quantidade de HSP 72 induzida pelo estresse foi maior no sóleo que no extensor longo dos dedos (tipo II), e o aumento em ambos os músculos foi mais expressivo nos animais sacrificados duas horas após o exercício. Esses picos iniciais de HSP encontrados no período pós-exercício retornaram aos valores de repouso aproximadamente em 5 a 6 horas.

No entanto, Salmelman (2000) observou que ratos treinados em esteira, 60 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 16 a 20 semanas, apresentaram um aumento dos níveis de HSP 72 no sóleo, mas, na cabeça lateral do músculo gastrocnêmio (tipo II) não houve diferença no conteúdo de HSP 72 em relação aos animais sedentários. O autor sugere que no treinamento aeróbio, com exercícios submáximos e não exaustivos, o sóleo pode ter sido mais recrutado que o gastrocnêmio para induzir a expressão de HSP.

Em concordância com os resultados do presente estudo, Smolka et al. (2000) usaram dois protocolos de exercícios para um treinamento de oito semanas: exercício contínuo com intensidade moderada e exercício intermitente com alta intensidade. Ao final do treinamento realizou um exercício de exaustão nos animais treinados e sedentários. Após o treinamento, os animais de ambos os grupos demonstraram alta resistência ao exercício até exaustão. Além disso, a exaustão não resultou na indução de HSP 72 ou diminuição da atividade de enzimas antioxidantes em nenhum dos grupos de animais treinados. A interpretação dada pelos autores é que a exaustão foi menos estressante para os ratos treinados devido a elevada atividade de enzimas antioxidantes preexistentes no músculo sóleo desses animais. É possível que espécies reativas de oxigênio ataquem proteínas musculares dos ratos sedentários e sinalizem para a indução de HSP 72 após a exaustão. Por outro lado, se o sistema enzimático antioxidante preexistente é suficiente para evitar ou minimizar o ataque das espécies reativas de oxigênio, a indução de HSP 72 pode não ser iniciada ou ser levemente expressiva (Smolka et al., 2000).

Torna-se importante destacar que modelos de exercício forçado para animais (corrida em esteira rolante; natação), ao contrário da corrida voluntária (Shyu et al., 1976), provocam alterações nas respostas neuroendócrinas e imunológicas comumente associadas ao estresse crônico (Rupp, 1989; Moraska et al., 2000) o que pode afetar a expressão de HSPs. Sendo assim, diversas questões merecem atenção quanto ao modelo, volume e intensidade do exercício que sejam capazes de elevar significativamente a expressão de

HSP 72 no músculo. Mudanças na intensidade ou na duração do exercício podem provocar diferentes efeitos na depleção do glicogênio e no aumento dos radicais livres.

5. Conclusões

- O treinamento em natação, durante o período de 17 semanas, não influenciou no peso corporal e no peso absoluto e relativo do miocárdio e dos músculos sóleo e reto femoral de ratos *Wistar*.
- Houve melhora na capacidade aeróbia dos ratos, demonstrada pela maior resistência ao treinamento e pela concentração de lactato sanguíneo levemente reduzida, nos ratos treinados, durante o teste de exaustão.
- Os ratos treinados apresentaram diminuição no percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo. Contudo, não houve alteração significativa na área das fibras dos tipos I e II nos músculos SO e RF entre ratos treinados e sedentários. Porém, o treinamento não promoveu modificações na proporção volumétrica de fibras musculares, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo no miocárdio.
- O exercício exaustivo induziu lesões nas fibras dos músculos SO e RF de ratos sedentários e treinados, contudo não foi detectado aumento acentuado de mastócitos e nem a ocorrência de grandes focos inflamatórios. A microvascularização no músculo sóleo aumentou nos grupos TN e TNE, enquanto no reto femoral ocorreu aumento significativo apenas no grupo TNE.
- Núcleos positivos à reação de TUNEL foram escassos nas fibras do músculo sóleo e reto femoral de animais sedentários e treinados submetidos ao teste de exaustão. Também não ocorreu uma variação significativa nos níveis de HSP 70 nos animais sedentários e treinados submetidos ao teste exaustivo.

6. Referências Bibliográficas

ADAMS, J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes & Development**, v.17, p.2481-2495, 2003.

ADAVANI, S.V., GEENEN, D., MALHOTRA, A., FACTOR, S.M., SCHEUER, J. Swimming causes myosin adaptations in the rat cardiac isograft. **Circulation Research**. v. 67, n. 3, p. 780-783, 1990.

ADHIHETTY, P.J., HOOD, D.A. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. **Basic and Applied Myology**. v.13, n. 4, p.171-179, 2003.

ADOLFSSON, J., LJUNGQVIST, G., TORNLING, G., UNGE, G. Capillary increase in the skeletal muscle of trained young and adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 310, p. 529-532, 1981.

AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. **Resource book for the design of animal exercise protocols**. Feb, 2006, 152p.

ANDERSEN, J.L., SCHJERLING, P., SALTIN, B. Muscle, genes and athletic performance. **Scientific American**, v. 283, n.3, p. 48-55, 2000.

ARENDS, M.J., WYLLIE, A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. **International Review of Experimental Pathology**, v. 32, p.223-54, 1991.

ARMSTRONG, R.B. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 22, n. 4, p. 429-435, 1990.

ARSLAN S., ERDEM S., SIVRI A. et al. Exercise-induced apoptosis of skeletal muscle and the effect of meloxicam. **Rheumatology International**, v. 21, n.4, p.133-6, 2002.

ATALAY, M., OKSALA, N.K., LAAKSONEN, D.E., KHANNA, S., NAKAO, C., LAPPALAINEN, J., ROY, S., HANNINEN, O., SEN, C.K. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, p. 605-611, 2004.

BASSAN, J.C., ROMÁN, J.L., GONZÁLEZ, A.B.M., ROCAMORA, M.T.M., GARCIA, J.A.V. **Ácido láctico: atualização no desporto e no esforço físico**. Disponível em:
<www.invesalia.com/descargas/Publicaciones/Lactato_portugues.pdf> Acesso em: 12 de Mai. 2007.

BENJAMIN, I.J., MCMILLAN, D.R.. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**. 83: 117-132, 1998.

BENNETT, M.R., GIBSON, D.F., SCHWARTZ, S.M., TAIT, J.F. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. **Circulation Research**. v.77, p. 1136-1142, 1995.

BISCHOFF, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. **Development**, v.109, p.943-952, 1990.

BLOOR, C.M. Angiogenesis during exercise and training. **Angiogenesis**. v. 8, p. 263-271, 2005.

BOLTER, C.P., GORDON, B.L. Cholinergic responses of isolated atria from swim-trained rats. **European Journal of Applied Physiology**. v. 51, p. 231-236, 1983.

BUCCI, M., VINAGRE, E.C., CAMPOS, G.E.R., CURI, R., PITHON-CURI, T.C. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. v. 13, n. 1, , p. 17-28, 2005.

CADENAS, E., DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, n.3-4, p. 222-230, 2000.

CAMARGO, P.B., VOLTARELLI, F.A., OLIVEIRA, C.A.M., PAIVA, M.F., GOBATTO, C.A., MELLO, M.A.R. Metabolismo protéico no músculo esquelético de ratos submetidos a exercício em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista digital – Buenos Aires**, v. 10, n. 93, Feb., 2006. Disponível em < <http://www.efdeportes.com/efd93/limiar.htm> >. Acesso em: 10 Mai. 2006.

CARLSON, M.B., FAUKNER, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**. v. 15, n.3, p. 187-198, 1983.

CARVALHO, H.F., COLLARES-BUZATO, C.B. Célula muscular estriada esquelética. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri, SP: Manole, 2005. 450 p.

CHARGÉ, S.B.P., RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CIABATTARI, O., DAL PAI, A., DAL PAI, V. Efeitos da natação associada a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 11, n. 2, p. 121-125, 2005.

CLARKSON, P.M, SAYERS, S.P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 24, n. 3, p. 234-248, 1999.

CLEBIS, N.K., NATALI, M.R.M. Lesões musculares provocadas por exercícios excêntricos. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, v. 9, n. 4, p. 47-53, 2001.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

CROWTHER, G.J., JUBRIAS, S.A., GRONKA, R.K. et al. A “functional biopsy” of muscle properties in sprinters and distance runners. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, n. 11, p.1719–1724, 2002.

DAWSON, C.A., HORVARTH, S.M. Swimming in small laboratory animals. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 2, p. 51-78, 1970.

DEMIREL, A.H., POWERS, S.K., NAITO, H., HUGHES, M., COOMBES, J.S. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. **Journal Applied of Physiology**, v. 86, n. 3, p. 1002-1008, 1999.

DONOVAN, C.M., BROOKS, G.A. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. **American Journal of Physiology**, v.244, n.1, p.83-92, 1983.

DONOVAN, C.M., PAGLIASSOTTI, M.J. Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training. **Journal Applied of Physiology**, v.68, n.3, p. 1053-1058, 1990.

DUARTE, J.A., MOTA, M.P., NEUPARTH, M.J., APEEL, H.J., SOARES, J.M.C. Miopatia do exercício. Anatomopatologia e fisiopatologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 1, n. 2, p. 73-80, 2001.

EFTHIMIADOU, A., ASIMAKOPOULOS, B., NIKOLETTOS, N., GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., PAPACHISTOU, E.K. Angiogenic effect of intramuscular administration of basic and acidic fibroblast growth factor on skeletal muscles and influence of exercise on muscle angiogenesis. **British Journal of Sports Medicine**, v. 40, p. 35-39, 2006.

EVANGELISTA, F.S., BRUM, P.C., KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1751-1759, 2003.

FAVIER, R.J., CONSTABLE, S.H., CHEN, M., HOLLOSZY, J.O. Endurance exercise training reduces lactate production. **Journal Applied of Physiology**, v. 61, n.3, p.885-889, 1986.

FINK, W.J., COSTILL, D.L., POLLOCK, M.L. Submaximal and maximal working capacity of elite distance runners. Part II. Muscle fiber composition and enzyme activities. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 301, p. 323-327, 1977.

FINK, S.L., COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.

FOSS, M.F., KETEVIAN, S.J. **Bases fisiológicas do exercício e do esporte**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 560 p.

FLÜCK, M. Functional, structural, and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2239-2248, 2006.

GOBATTO, C.A., MELLO, M.A.R., SIBUYA, C.Y., AZEVEDO, J.R.M., SANTOS, L.A., KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130(A), p. 21-27, 2001.

GONÇALVES, T. A levedura como modelo de apoptose: alterações bioquímicas e ciclo celular. **Revista da FML**, v. 3, n.6, p.357-363, 1998.

GONZÁLEZ, B., HERNANDO, R., MANSO, R. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercise skeletal muscle. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 440, p. 42-49, 2000.

GROUND, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathology, Research and Practice**, n.187, p. 1-22, 1991.

GUIMARÃES, C.A., LINDEN, R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. **European journal of biochemistry / FEBS**. n.271, p.1638-1650, 2004.

GUL, M., DEMIRCAN, B., TAYSI, S., OSTAZAN, N., GUMUSTEKIN, K., SIKAN, E., POLAT, M.F., AKAR, S., AKCAY, F., DANE, S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on oxidant defense mechanisms in rat heart. **Comparative Biochemistry And Physiology**. v. 143(A), p. 239-245, 2006.

GÜNDÜZ, F., SENTÜRK, Ü.K., KURU, O., AKTEKIN, B., AKTEKIN, M.R. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. **Physiological research**. v. 55, n. 2, p. 171-176, 2004.

HAMMOND, G.L., LAI Y., MARKERT, C.L. Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.79, p. 3485-3488, 1982.

HAWKE, T.J., GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**. v. 91, p. 534-551, 2001.

HAWLEY, J.A. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v.29, p. 218-222, 2002.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERNANDO, R., MANSO, R. Muscle fibre stress in response to exercise: synthesis, accumulation and isoform transitions of 70-kDa heat-shock proteins. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 243, p. 460-467, 1997.

HICKSON, R.C., HEUSNER, W.W., HUSS, W.D.V. Skeletal muscle enzyme alterations after sprint and endurance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 40, n. 6, p. 868-872, 1975.

HOCKENBERY, D. Defining apoptosis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 6-19, 1995.

HURME, T. KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 24, n. 2, p.197-205, 1992.

IKEDA, S., MIYAZAKI, H., NAKATANI, T., KAI, Y., KAMEI, Y., MIURA, S., EZAKI, O. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 296, p. 395-400, 2002.

ISHIHARA, A., ROY, R.R., OIHA, Y., IBATA, Y., EDGERTON, R. Hypertrophy of rat plantaris muscle fibers after voluntary running with increasing loads. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 6, p. 2183-2189, 1998.

JÄRVINEN. T.A.H., JÄRVINEN, T.L.N., KÄÄRIÄINEN, M., KALIMO, H., JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 5, p.745-64, 2005.

JASSON, E., KAIJSER, L., Muscle adaptation to extreme endurance training in man. In REI, W.D., SHANKS, J., SAMRAI, B. Regional and fiber-tupe percentages and sizes in the hamster diaphragm after swim training. **Physical Therapy**, v. 77, n. 2, 1997.

JEJURIKAR, S.S., KUSON Jr, W.M. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. **Apoptosis**, v. 8, p. 573-578, 2003.

KERR, J. F., WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon wth wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p.239-257, 1972.

KIANG, J.G., TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, p.183-201, 1998.

KNAAPEN, M. W. M., DAVIES, M.J.: De BIE, M.; HAVEN, A.J.; MARTINET, W.; KOCKW, M. M. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. **Cardiovascular Research** 51: 304-312, 2001.

KOURY, J.C., DONANGELO, C.M., Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, P. 433-441, 2003.

KREGEL, K.C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 2177-2186, 2002.

LAMB, G.D., STEPHENSON, D.G. Point: Lactic acid accumulation is an advantage during muscle activity. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p. 1410-1414, 2006.

LANA, A.C., GONÇALVES, I.D., PAULINO, C.A. Influência dos exercícios físicos sobre a massa corporal e o peso relativo de alguns órgãos de ratos *Wistar*. **Universidade Bandeirante de São Paulo. Departamento de pós-graduação – São Paulo, Brasil**. Disponível em http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/179.PDF. Acesso em: 13 de mai. 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of sctructural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAUGHLIN, M.H., MOHRMAN, S.J., AMSTRONG, B. Muscular blood flow distribution patterns in the hindlimb of swimming rats. **The American Journal of Physiology**, v. 246, n.15, p.H398-H403, 1984.

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, p. 373-381, 2005.

LEITE, E.P., BOMBONATO, P.P., SANTANA, M.I.S. Morfometria do tecido conjuntivo do coração de eqüinos PSI. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 162-168, 2004.

LENNOM, S.L., QUINDRY, J., HAMILTON, K.L., FRENCH, J., STAB, J., MEHTA, J.L., POWERS, S.K. Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p.1299-19305, 2004.

LEPORE, D.A., HUELEY, J.V., STEWART, A.G., MORRISON, W.A., ANDERSON, R.L. Prior heat stress improves survival os ischemic-perfused skeletal muscle in vivo. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 1847-1855, 2000.

LESCAUDRON, L., PELTÉKIAN, E., FONTAINE-PÉRUS, J., PAULIN, D., ZAMPIERI, M., PARRISH, E. Blood bone macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p. 72-80,1999.

MAAG, R.S., HICKS, S.W., MACHAMER, C.E. Death from wthin: apoptosis and the secretory pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 456-61, Aug.,2003.

MACRAE, H.S., DENNIS, S.C., BOSCH, A.N., NOAKES, T.D. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. **Journal Applied of Physiology**, v. 73, n. 5, p. 2205-2207, 1992.

MATSAKAS, A., BOZZO, C., CACCIANI, N., REGGIANI, C., MASCARELLO, F., PATRUNO, M. Effect swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and cardiac muscle of rats. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 6, p. 983-994, 2006.

MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 9, n. 493-495, 1961.

McARDLE, W.D., KATCH, F.I., KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4 ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 695 p.

MEDEIROS, A., GIANOLLA, R.S., KALIL, L.M.P., BACURAU, R.F.P., ROSA, L.F.B.C., NEGRÃO, S.E., BRUM, P.C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. **Revista Paulista de Educação Física**, V. 14, n. 1, p. 7-15, 2000.

MEDEIROS, A., OLIVEIRA, E.M., GIANOLLA, R.S., CASARINI, D.E., NEGRÃO, S.E., BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1909-1917, 2004.

MICHAEL, J. A. **Ciência da flexibilidade**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 1999. 365 p.

MINAMOTO, V.B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 55, 2005.

MISUMI, K., SAKAMOTO, H., SHIMIZU, R. Changes in skeletal muscle composition in response to swimming training for young horses. **The Journal of Veterinary Medical**. v. 57, n. 5, p. 959-961, 1995.

MONTEIRO, E.M., SHIMOKOMAK, M., SILVA, M.D.P., DAL PAI, V. Efeito do genótipo nas características morfológicas e histoquímicas do *longissimus dorsi* e em alguns parâmetros quantitativos das carcaças de cordeiros. **Ciência Agrotécnica, Lavras**, v. 24, (Edição Especial), p.153-162, 2000.

MORALES-LOPEZ, J.L. AGUERA, E., MIRO, F., DIZ, A. Variations in fiber composition of the gastrocnemius muscle in rats subjected to speed training. *apud* MINAMOTO, V.B. Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 12, n. 3, p. 55, 2005.

MORASKA, A, DEAK, T., SPENCER, R.L. ROTH, D., FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in sprague-dawley rats. **The American Journal of Physiology**. v. 279, p. R1321-R1329, 2000

MORTON, J.P., MacLAREN, D.P., CABLE, N.T., BONGERS, T., GRIFFITHS, R.D., CAMPBELL, I.T., EVANS, L., KAYANI, A., McARDLE, A., DRUST, B. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n.1, p. 176-82, 2006.

MOSELEY, P.L. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 5, p. 1413-1417, 1997.

NAKAO, C., OOKAWARA, T., KIZAKI, T., OH-ISHI, S., MIYAZAKI, H., HAGA, S., SATO, Y., JI, L.L., OHNO, H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 649-654, 2000.

NATALI, A.J. Effects of voluntary exercise on the function of cardiac myocytes. Doctor of Philosophy Thesis, School of Biomedical Sciences, University of Leeds, 2000.

NEUFER, P., ORDWAY, G.A., HAND, G.A., SHELTON, J.M., RICHARDSON, J.A., BENJAMIN, I.J., WILLIAMS, R.S. Continuous contractile activity induces fiber type specific expression of HSP70 in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 271, p.C1828-C1837, 1996.

NOBLE, E.G., HO, R., DZIALOSZYNSKI, T. Exercise is the primary factor associated with HSP70 induction in muscle of treadmill running rats. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 187, p. 495-501, 2006.

NOMURA, K., IMAI, H., KOUMURA, T., KOBAYASHI, T., NAKAGAWA, Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia induced apoptosis. **The Biochemical Journal**. v.

OISHI, Y., TANIGUCHI, K., MATSUMOTO, H., ISHIHARA, A., OHIRA, Y., ROY, R.R. Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. **Journal Applied of Physiology**, v. 92, p. 1097-1103, 2002.

PAPOTI, M., ALMEIDA, P.B.L., PRADA, F.J.A., ELENO, T.G., HEERMINI, H.A., GOBALTO, C.A., MELLO, M.A.R. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz, Rio Claro**, v.9, n.2, p.103 – 110, 2003

PEIJIE, C., ZICAI, D., HAOWEEN, X., RENBAO, X. Effects of chronic and acute training on glucocorticoid receptors concentrations in rats. **Life Sciences**. v. 75, p. 1303-1311, 2004.

PETTE D, STARON RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. **International Review of Cytology**, v. 170, p. 143-223, 1997.

PHANEUF, S., LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, p. 393-396, 2001.

PODHORSKA-OKOLOW, M., SANDRI, M., ZAMPIERI, S., BRUN, B., ROSSINI, K., CARRARO, U. Apoptosis of myofibers and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 24, n. 6, p. 518-531, 1998.

PORWERS SK, LOCKE M, DEMIREL HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, p. 386-392, 2001.

PRADA, F.J.A., VOLTARELLI, C.A.M.O., GOBATTO, C.A., MACEDO, D.V., MELLO, M.A.R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, v. 12, n. 2, p. 29-34, 2004.

PRIOR, M.B., YANG, H.T., TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? **Journal of Applied Physiology**, v. 97, p. 1119-1128, 2004.

RANDHAWA, S.A.S. Desmystified: apoptosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 55-63, 2000.

REID, W.D., SHANKS, J., SAMRAI, B. Regional and fiber-type percentages and size in the hamsters diaphragm after swim training. **Physical Therapy**. v. 77, n.2, p. 178-186, 1997.

RENDE, M., BRIZI, E., CONNER, J., TREVES, S., CENSIER, K., PROVENZANO, C., TAGLIALATELA, SANNA, P.P., DONATO, R. Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrKA. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**. v. 18, p. 869-885, 2000.

ROY, R.R., HUTCHISON, L.D., PIEROTTI, J.D., HODGSON, J.A., EDGERTON, V.R. EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 6, p. 2522-2529, 1991.

RUPP, H. Differential effect of physical exercise routines on ventricular myosin and peripheral catecholamines stores in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**. v. 65, p. 370-377, 1989.

SAAD, P.C.B., GUIMARÃES, A., DAL PAI, V., KROLL, B. Análise histológica e histoquímica das fibras dos músculos reto do abdome e intercostal paraesternal de ratos submetidos ao exercício da natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 4, 2002.

SALO, D.C., DONAVAN, C.M., DAVIES, K.J. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. **Free Radical Biology & Medicine** v. 11, p. 239-246, 1991.

SALTIN, B., GOLLNICK, P.K. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism performance. In: **L.D. Peachey (ed.) Handbook of Physiology, Sec. 10, Skeletal Muscle**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, pp. 555-631.

SAMELMAN, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. **Experimental Physiology**, v. 85, n. 1, p. 97-102, 2000.

SÁNCHEZ-TORRES, L. E., VARGAS, F.D. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. **Anales de la Sociedad Mexicana de Historia de la Ciencia y de la Tecnología**, v. 41, n. 1, p. 49-62, 2003.

SANDRI, M., CARRARO, U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 12, p. 1373-1390, 1999.

SARASTE, A., PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-537, 2000.

SCHNEIDER, C.D., OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 10, n. 4, 2004.

SHEEHAN, D.C. & HRAPCHAK, B.B. **Theory and Practice of Histotechnology**. 2^a. th., Saint Louis, Battelle Memorial Institute, 1987.

SHYU, B.C., THOREN, P. Circulatory events following spontaneous muscle exercise in normotensive and hypertensive rats. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 128, p. 515 – 524, 1976.

SILVA, E.F.H., MINAMOTO, V.B. Análise da lesão e área dos tipos de fibras do músculo sóleo de rato após treinamento. Relatório de projeto do PIBIC. Disponível em < <http://www2.unimep.br/mostracademica4/trab/trabpdf/209.pdf> >. Acesso em: 10 Mai., 2007.

SIMON, C.R., RAMOS, R.G.P. Death by fine tuning. **Brazilian Journal of Morphology and Science**, v. 23, n.1, p. 3-13, 2006.

SIU, P.M., BRYNER, R.W., MARTYN, J.K., ALWAY, S.E. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 10, p. 1150-1152, 2004.

SIU, P.M., BRYNER, R.W., MURLASITS, Z., ALWAY, S.E. Response to XIAP, ARC, and FLIP apoptotic suppressors to 8-weeks of treadmill running in rat heart and skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 1, p. 204-209, 2005.

SKIDMORE, R., GUTIERREZ, J.A., GEURRIRO, V., KREGAL, K.C. HSP 70, induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. R92-R97, 1995

SMOLKA, M.B., ZOPPI, C.C., ALVES, A.A., SILVEIRA, L.R., MARANGONI, S., PEREIRA-DA-SILVA, L., NOVELLO, J.C., MACEDO, D.V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology**. v. 279, p. R1539-R1545, 2000.

SNOECKX, L. H. E. H., CORNELUSSEN, R. N., NIEUWENHOVEN, F. A. V., RENEMAM, R. S., VUSSE, G. J. V. D. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 81: 1461-1497, 2001.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science**, v. 267, p. 1445-1449, 1995.

St. PIERRE, B.A., TIBDALL, J.G. Differential response of macrofage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n.1, p. 290-296, 1994.

TAKAHASHI, M., KUBOTA, S. Exercise-related novel gene is involved in mioblast differentiation. **Biomedical Research**. v. 26, n. 2, p. 79-85, 2005.

TERADA, S., TABATA, I., HIGUCHI, M. Effect of high-intensity intermittent swimming training of fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. **Japanese Journal of Physiology**. v. 54, p. 47-52, 2004.

TERJUNG, R.L. Adaptações musculares ao treinamento aeróbio. **Gatorage sports science institute: Sports science exchange**, v.14, Nov./Des,1997.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American journal of physiology**. v. 288, p. R345-R353, 2005.

TRICOLI, V. Mecanismos envolvidos na etiologia da dor muscular. **Revista Brasileira Ciência e Movimento**, v. 9, n. 2, p. 39-44, 2001.

VENDETTI, P., Di MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.

VERZOLA, R.M.M., MESQUITA,R.A., RAMOS, O.H.P. MORISCOT, A.S., PEREZ, S.E., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 621-627. 2006.

VIRU, M. Differences in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 34, n. 3, p. 217-227, Sep., 1994.

VOLTARELLI, F.A., GOBATTO, C.A., MELLO, M.A.R. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeitos dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 4, n. 3, p. 6-25, 2004.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**. v.72, n.4, p. 1063-108, 1992.

WILLAMS, P.E., GOLDSPINK, G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. **Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 45-55,1973.

YONG, D., ROSENBLATT, J.D., PARRY, D.J. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. **Muscle & nerve**, v. 17, n. 6, p. 608-613, 1994.

APÊNDICE

1. Sistema TUNEL para identificação de apoptose (kit da PROMEGA®)

1. Desparafinização em três banhos de xilol I, II, III e tratamento com uma solução em partes iguais de álcool absoluto e xilol.
2. Dois banhos de álcool absoluto (no mínimo 3 minutos em cada banho) e tratamento com uma seqüência de soluções alcoólicas em concentração decrescente (95, 80, 70 e 50%): 3 minutos em cada solução.
3. Tratamento com solução de cloreto de sódio a 0,85% durante 5 minutos em temperatura ambiente.
4. Banho em PBS (tampão fosfato salino) durante 5 minutos.
5. Fixação dos cortes numa solução de paraformaldeído a 4% durante 15 minutos.
6. Dois banhos em PBS: 5 minutos cada banho.
7. Remoção do líquido e acomodação das lâminas numa superfície plana (interior de uma placa de Petri ou de uma bandeja plástica). Adicionar 100 µl de Proteinase K sobre cada corte, na concentração de 20 µg/ml de PBS, seguido de incubação durante 10 minutos.
8. Um banho em PBS por 5 minutos.
9. Tratamento com paraformaldeído a 4% durante 5 minutos.
10. Um banho em PBS durante 5 minutos.
11. Em seguida, tratamento de cada corte com 100µl do tampão (*equilibration buffer*) utilizado no meio de incubação, durante 10 minutos.

Meio de incubação:

Componente	Volume por 100 µl
<i>Equilibration buffer</i>	98 µl
Nucleotídio + Biotina	1 µl
Enzima rTdT	1 µl
Desoxinucleotidil transferase	

* Multiplicar os valores do volume pelo número de cortes histológicos

12. Pingar **100 µl do meio de incubação sobre cada corte**, cobrindo-o imediatamente com uma lamínula plástica. Incubação a 37°C durante 60 minutos numa câmara umedecida (as lâminas podem ficar acomodadas numa placa de Petri ou bandeja plástica com papel filtro umedecido com água deionizada)
 13. Diluição do componente SSC*, 20X em água deionizada (1:10). Colocar os cortes nesta solução durante 15 minutos à temperatura ambiente.
 14. Dois banhos em PBS: 5 minutos cada banho.
 15. Bloqueio das peroxidases endógenas imergindo as lâminas em peróxido de hidrogênio 0,3% durante 3-5 minutos em temperatura ambiente.
 16. Dois banhos de PBS: 5 minutos cada banho.
 17. Diluição da solução de estreptavidina HRP (1:500) em PBS. Adição de 100 µl para cada corte e incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente.
 18. Dois banhos em PBS: 5 minutos cada banho.
 19. Preparar a solução de DAB (diaminobenzidina) do seguinte modo: 50 µl do substrato/DAB + 950 µl de água deionizada + 50 µl do cromógeno/DAB + 50 µl de peróxido de hidrogênio. Cobrir cada corte com 100 µl desta solução até que os cortes passem a ter coloração marrom (tempo aproximado para revelação da cor: 10 minutos).
 20. Quatro banhos em água deionizada: 5 minutos cada banho.
 21. Montagem dos cortes em meio aquoso com glicerina.
- * SSC, 20X: 87.7 g NaCl + 44,1 g de citrato de sódio. Diluir em 400 ml de água deionizada e ajustar o pH para 7.2 com solução de hidróxido de sódio 10N, completando o volume para 500 ml. O SSC, 20X vem preparado no kit da PROMEGA, numa embalagem contendo 70 ml.

Preparo dos reagentes:

Fórmula do PBS:

137 mM de NaCl

2,68 mM de KCl

1,47 mM de KH_2PO_4

8,1 mM de Na_2HPO_4

Cálculo para conversão de mM em gramas:

NaCl: cloreto de sódio

PM = 58,44 = 58,44 g/mol

Para 1 Litro de solução:

1M NaCl -----58,44 g

1mM-----0,05844 g

137 mM-----X

X = 8,00628g de NaCl

KCl: cloreto de potássio

PM = 74,56 = 74,56 g/mol

Para 1 Litro de solução:

1M KCl-----74,56g

1mM-----0,07456g

2,68mM-----X

X = 0,1998208g de KCl

KH_2PO_4 : fosfato de potássio monobásico

PM = 136,09 = 136,09g/mol

Para 1 Litro de solução:

1M de KH_2PO_4 -----136,09g

1mM-----0,13609g

1,47mM-----X

X = 0,2000523g de KH_2PO_4

Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico

PM= 268,07 g/mol

Para 1 Litro de solução:

1M de Na₂HPO₄-----268,07g
1mM----- 0,26807g
8,1mM----- X

X = 2,171367g de Na₂HPO₄

Fórmula do Tampão para Proteinase K

100 mM de Tampão Tris/HCl (pH: 8,0)

5 mM de EDTA

Cálculo para conversão de mM em gramas:

TRIS

PM= 121,14g/mol

Para 1 litro de solução:

1M de TRIS-----121,14 g
1mM-----0,12114g
100 mM-----X

X = 12,114g de TRIS

EDTA

PM= 374,24g/mol

Para 1 litro de solução:

1M de EDTA-----374,24g
1mM-----0,374,24g
50mM-----X

X = 18,612g de EDTA

Cálculo do volume de HCl:

$$D=m/v$$

$$V=m/d$$

$$m_{\text{HCl}}= 3,646\text{g}$$

$$d_{\text{HCl}}= 1,19\text{g/l}$$

$$v=3,646 \text{ g}/1,19*1000 \text{ g/mL}$$

$$v= 3,06 \text{ mL}$$

$$3,06 \text{ mL}-----100\% \text{ (puro HCl)}$$

$$X-----37\%$$

$$X = 9,8\text{mL de HCl}$$

Observação: Misturar o EDTA e o TRIS. Adicionar 400 mL de água destilada. Colocar o ácido clorídrico e verificar o pH (pH; 8,0). Adicionar água destilada até completar 1 litro.

Tampão I Dnase:

Fórmula do tampão:

40 mM de TRIS-HCl (PH=7,9)

10 mM de NaCl

6 mM de MgCl₂

10 mM de CaCl₂

Cálculo para conversão de mM em gramas:

TRIS

PM= 121,14g/mol

Cálculo para 1 litro de solução:

1M-----121,14g

1mM-----0,12114g

40 mM-----X

X = 4,8456g de TRIS

NaCl

PM = 58,44 g/mol

Cálculo para 1 litro de solução:

1M-----58,44g

1mM-----0,5844g

10mM-----X

X = 0,5844g de NaCl

MgCl₂ 6H₂O

PM = 203,30g/mol

Cálculo para 1 litro de solução:

1M-----203,30g

1mM-----0,20330g

6mM-----X

X = 1,2198g de MgCl₂ 6H₂O

CaCl₂

PM = 110,99g/mol

Cálculo para 1 litro de solução:

1M-----110,99g

1mM-----0,11099g

10mM-----X

X = 1,1099g de CaCl₂

OBS: Preparar 0,5 litros da solução de tampão TRIS

Solução de Paraformaldeído 4%:

Transformação de Paraformaldeído 40% para Paraformaldeído 4%:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$40 \cdot V_1 = 4 \cdot 1000$$

$$V_1 = 4000/40$$

V1= 100 mL de Paraformaldeído 40% + 900mL de água destilada

2. Reação para Succino-Desidrogenase (SDH)

A enzima succino-desidrogenase (SDH) é uma flavoproteína, presente na mitocôndria, que catalisa a oxidação de ácido succínico para ácido fumárico. A demonstração histoquímica da atividade da SDH é feita em cortes, obtidos no micrótomo criostato, de músculos na presença de um substrato (succinato) e de um redox-indicador (tetrazólio). Nas condições da reação, o tetrazólio (composto hidrossolúvel), ao receber íons hidrogênio é convertido em formazana (composto não hidrossolúvel) e que adquire cor azul marinho. Os pontos azul-escuros marcam mitocôndrias, mais numerosas nas fibras tipo I. As fibras tipo I também apresentam orlas subsarcolemas reativas.

Meio de incubação para SDH

- 10 ml de tampão fosfato 0,2M
- 270 mg de Succinato de Sódio
- 10 mg de NBT (*nitro blue tetrazólio*)

Procedimentos para a reação

- Colocar as lâminas em placas de petri revestindo o fundo com papel de filtro umedecido com água destilada;
- Incubar os cortes por 60 minutos à 37° C;
- Lavar os cortes com três banhos de água deionizada;
- Preparar soluções aquosas de acetona à 30, 60 e 90% com água deionizada;
- Tratar os cortes, após a reação, com as seguintes soluções de acetona: 90, 60 e 30% na respectiva ordem. Dois minutos de tratamento para cada solução;
- Lavar com água deionizada e montar as lâminas com meio aquoso (xarope de Apathy).

Xarope de Apathy

Açúcar cristalizado	50 g
Goma arábica	50 g
Água	50 ml
Timol	1 cristal

O açúcar e a goma arábica são dissolvidos separadamente na água, sendo misturadas, logo após. A mistura é deixada na estufa a 37°C, até adquirir, por evaporação de parte da água, uma consistência espessa. É um meio que não precisa desidratação prévia à montagem e endurece rapidamente nas bordas da lamínula, dispensando lutagem posterior.

3. Eletroforese SDS-PAGE - Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE)

Eletroforese SDS-PAGE - Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) contendo detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada essencialmente como descrito por Laemmli (1970). O extrato de proteína foi incubado por 5 minutos, a 100° C, em tampão da amostra (glicerol 10% (v/v), SDS 2,3%, azul-de-bromofenol 0,25%, 2-mercaptoetanol 5% (v/v) e Tris-HCl 0,0625 mol/L, pH 6,8) antes de ser aplicado no gel. A eletroforese foi realizada por aproximadamente 16 horas, a 48 V, no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L, EDTA 1 mmol/L e SDS 3,5 mmol/L). Este procedimento foi feito para obtenção de 3 géis. Um destes foi corado com solução corante [metanol 40% (v/v), CH₃COOH 7,5% (v/v) e “coomassie brilliant blue” R-250 0,01%], por aproximadamente 12 horas, e descorado em solução descorante [metanol 10% (v/v) e ácido acético 7,5% (v/v)]. Os outros 2 géis foram submetidos à técnica de imunoblotting, para verificar se os anticorpos Anti-Heat Shock Protein 70 foram capazes de reconhecer as proteínas de interesse.