



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Ciências Biomédicas

**ELIANA S. CÂMARA-PEREIRA**

**“Análise morfológica da organização das miofibrilas do músculo esquelético de peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre na área de Ciências Morfológicas – Programa MINTER.

Orientadora: Profa. Cláudia dos Santos Mermelstein  
Co-orientador: Prof. Marcos André Vannier dos Santos  
Colaborador: Prof. Manoel Luís Costa

Rio de Janeiro  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Câmara-Pereira, Eliana S.

**“Análise morfológica da organização das miofibrilas do músculo esquelético de peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto”.**

Rio de Janeiro, UFRJ, ICB, 2007.

xvi, 101 p.

Dissertação de Mestrado em Ciências Morfológicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

1- músculo esquelético; 2- citoesqueleto; 3- miofibrilas 4- sarcômero; 5-peixe-zebra (*Danio rerio*)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

CÂMARA-PEREIRA, E. S. “Análise morfológica da organização das miofibrilas do músculo esquelético de peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto”.

[Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

**Eliana S. Câmara-Pereira**

Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_ - Orientadora

Prof. Cláudia dos Santos Mermelstein (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

\_\_\_\_\_ - Co-orientador

Prof. Marcos André Vannier-Santos (FIOCRUZ- Bahia)

\_\_\_\_\_ - colaborador

Prof. Manoel Luís Costa (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

\_\_\_\_\_ - Suplente e revisor

Prof. Leonardo Rodrigues de Andrade (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

\_\_\_\_\_ - Examinadora

Prof. Loraine Campanati Araújo de Andrade (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

\_\_\_\_\_ - Examinador

Prof. Leonardo Rodrigues de Andrade (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

\_\_\_\_\_ - Examinadora

Prof. Tecia Maria Ulisses de Carvalho (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ)

**Rio de Janeiro**

**2007**

## DEDICATÓRIA

A Deus, pela essência da VIDA;

A meus pais, Leonília e Francisco (*in memoriam*), mestres e incentivadores eternos;

A Jorge Câmara e a meus irmãos, fontes inesgotáveis de inspiração e motivação;

A meu esposo, Pio, pelo amor incondicional.

Com todo meu amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida;
- Aos professores Cláudia Mermelstein e Manoel Luís Costa, pela preciosa orientação, estímulo, valiosa ajuda e paciência, bem como pela forma exímia que conduzem suas atividades – atributos incentivadores imprescindíveis para a realização deste trabalho;
- Ao Profs. Marcos André Vannier, Leonardo Rodrigues de Andrade e Cláudio Pereira Ferreira, pela boa acolhida e auxílio prático – fruto de valiosas experiências profissionais;
- Aos Profs. Radovan Borojevic, Vivaldo Mora Neto, Fabiana Paim - idealizadores e efetivadores do Programa de Mestrado Interinstitucional, pelas palavras de esperança;
- Ao profs. Luiz Eurico Nasciutti, Ana Maria Blanco Martinez, Lenira Moura, Silvana Allodi, Christina Maeda Takiya, Maria Isabel Doria Rossi, Maria Eugênia Leite Duarte, Marcos Farina de Souza, José Garcia Abreu, Helena Marcolla Araujo, Stevens Rehen, Morgana Castelo Branco, Fani Mercante – como corpo docente, compartilhando o saber e incentivando às novas descobertas;
- Às colegas do laboratório de diferenciação muscular, Débora, Eliane, Fernanda, Roberta, Adriana, Carolina e Juliana, as quais experimentaram a expectativa de cada obtenção de resultados;
- A Noboro, por ter sempre uma idéia brilhante;

- Aos funcionários Jorge, Carlos, Ludmila, Lenna, Tânia, Rosângela e Silvania, pela presteza em atender;
- Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica (FIOCRUZ), Adriana, Eli, Rafael, Diego, Vanessa, Grazielle, Cristiane, Cíntia e Mara;
- Aos colegas de trabalho Erasmo de Almeida Jr., Maria Catarina de Araújo, Cristiane Malheiros, Caroline Dieder, Viviane Landulfo, Francine Soares, bem como aos colegas do C.T.I. Pediátrico das Obras Assistenciais Irmã Dulce;
- Aos amigos Marcos Almeida Matos, Sueli (Babi) Machado, Abrahão Fontes Baptista, Gerusa Abreu e Geovana Pereira, pelos gestos de carinho e cuidados à minha saúde em momentos delicados;
- A Laise Campos, mais do que amiga de todas as horas – irmã, vivenciando diariamente fracassos, vitórias e tristezas, mas infinitas alegrias;
- A meus pais, e a meus irmãos, por todo afeto e apoio;
- A Pio, esposo e amigo, pelos difíceis momentos de renúncia à sua companhia;
- Às famílias Câmara-Pereira, Monteiro Campos e Alves pelo apoio em cada etapa, incentivando-me a transpor os obstáculos, a superar desafios e a concretizar meus ideais;
- Compreendo e reconheço que jamais estive sozinha nesta jornada. Pessoas muito preciosas, mencionadas ou não, empreenderam de alguma forma neste ideal, as quais ofereço meu gestual de gratidão.

“Seus bons sentimentos,  
o que significam, se não aparecerem?  
E seu saber, de que adianta, se fica sem conseqüências?”.

(Bertold Brecht).

Este trabalho foi realizado sob as orientações da Profa. Claudia dos Santos Mermelstein (UFRJ-ICB) e do Prof. Manuel Luís Costa (UFRJ-ICB), co-orientação do Prof. Marcos André Vannier (FIOCRUZ-Ba) no período de março de 2005 a março de 2007. No decorrer do trabalho, contamos com intercâmbio interinstitucional entre a Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal do Rio de Janeiro e o Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz, na vigência de auxílios concedidos pela UFRJ e da UFBA – Programa MINTER. Participaram da execução desta dissertação os seguintes laboratórios:

- Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto, ICB, UFRJ
- Laboratório de Biomineralização, ICB, UFRJ
- Laboratório de Neuro-histologia e Ultraestrutura, ICB, UFRJ
- Laboratório de Neuroplastiidade, ICB, UFRJ
- Laboratório de Patologia Celular, ICB, UFRJ
- Laboratório Dra. Hertha Meyer de Ultraestrutura Celular, IBCCF, UFRJ
- Laboratório de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ – Bahia

## RESUMO

O músculo estriado esquelético possui um complexo aparato ultra-estrutural para sua atividade contrátil. A miogênese é o resultado de um processo que envolve várias etapas, como as seguintes: reconhecimento celular de mioblastos, adesão e fusão de mioblastos, e diferenciação celular que culmina com o surgimento de células alongadas, multinucleadas e cilíndricas (os miotubos). O peixe-zebra (*Danio rerio*), modelo vertebrado bastante estudado (fase embrionária) possui desenvolvimento rápido. Neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo de fixação do músculo esquelético do peixe adulto com isopentano, preservando-se a estrutura das miofibrilas, e possibilitando assim o estudo estrutural de estriações transversais sarcoméricas e de elementos não miofibrilares, como mitocôndria, núcleos, células satélites, retículo sarcoplasmático e túbulos T. Inibição de marcações inespecíficas foi imprescindível ao estudo da presença e distribuição de proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto no músculo do peixe-zebra. A autofluorescência foi uma limitação para a realização de duplas marcações de fluorescência nesse modelo biológico. Este trabalho de dissertação se baseou no uso das técnicas de histoquímica, microscopia de imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. Realizamos análise da distribuição das proteínas do citoesqueleto como desmina, alfa-actinina, titina, nebulina, miosina tipo II, miosina de fibras rápidas, tropomiosina e troponina T na organização de miofibrilas do músculo esquelético do peixe-zebra adulto, além de identificarmos a preservação da periodicidade das estriações do sarcômero por meio da morfometria.

## ABSTRACT

Striated skeletal muscle has a complex structural apparatus for its contractile activity. Myogenesis is the result of process that involves many steps, such as: the cellular recognition of myoblasts, adhesion and fusion of myoblasts, and cellular differentiation that ends with the formation of multinucleated and cylindrical structures (myotubes). The zebra-fish, vertebrate model sufficiently studied (embryonic phase) possesses fast development. In this work it was possible to establish a fixation protocol for the skeletal muscle of the adult zebra-fish using isopentane, making possible the preservation of the myofibrils and non-striated elements, such as mitochondria, nuclei, satellite cells, sarcoplasmic reticulum and transverse tubules T. Inhibition of not specific binding had been important to the study of the presence and distribution of sarcomeric and cytoskeletal proteins in the zebra-fish muscle. The autofluorescence was a limitation for the accomplishment of double labeling of fluorescent markers in this biological model. This work was based on the use of techniques, such as histochemistry, immunofluorescence microscopy and transmission electron microscopy. Our group concentrated in the analysis of the distribution of the following cytoskeletal proteins: desmin, titin, nebulin, myosin type II, fast twitch myosin, tropomyosin, and troponin T, in the organization of myofibrils in the skeletal muscle of adult zebra-fish. We identify the preservation of the regularity individual units of sarcomere.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- Actina F – actina filamentosa  
Actina G – actina globular  
ATP – adenosina trifosfato  
ATPase – adenosina trifosfato sintase  
bHLH – proteínas básicas do tipo hélice-alça-hélice  
BMP4 – proteína morfogênica óssea tipo 4  
Ca<sup>2+</sup> – íons Cálcio  
CapZ - proteína capeadora  
CH<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - álcool metílico  
DABCO – 1,4-diazabicyclo-2-(2.2.2)octano  
DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindole dihidroclorato  
DIC - contraste interferencial diferencial  
FAK – proteína cinase de adesão focal  
FGF – fator de crescimento de fibroblastos  
FITC – isotiocianato de fluoresceína  
Hhh – hedgehog, via de sinalização para a determinação e padrão celular durante o desenvolvimento de embriões  
HLH – proteínas do tipo hélice-alça-hélice sem o domínio básico  
hpf - horas pós-fertilização  
IF - filamentos intermediários  
IGF – fator de crescimento de insulina  
IgG – imunoglobulina G  
kDa - quilodaltons  
MEF-2 - fator estimulatório miocítico tipo 2  
MET – microscopia eletrônica de transmissão  
Mg<sup>2+</sup> – íons Magnésio  
Mgn – miogenina  
MHCII - isoforma de miosina tipo II  
miRNA – RNA interferencial  
MO – microscopia óptica  
MRFs – fatores regulatórios miogênicos

NaCl – cloreto de sódio  
NADH – dinucleotídeo nicotinamida adenina hidrogenase  
NADPH – NADP reduzido  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato dibásico de sódio  
NaHPO<sub>4</sub> – fosfato monobásico de sódio  
NaOH – hidróxido de sódio  
NH<sub>4</sub>Cl - representação molecular de cloreto de amônio  
nm - nanômetro  
Notch – via que controla o destino celular por interação direta célula-célula  
OTC – composto para criopreservação de tecidos (Temperatura crítica ótima)  
PBS – tampão fosfato com salina  
PFA - paraformaldeído  
pH – potencial hidrogênionico  
RNA – ácido ribonucleico  
SBF – soro fetal bovino  
SFLS – fibras de stress  
Shh – sonic hedgehog  
TGF-beta – fator tumoral de crescimento transformante  
TGR – receptor de fator de crescimento transformante  
TnC – troponina ligada ao cálcio  
TnI - troponina inibidora  
TnT – troponina que se liga à tropomiosina  
TRICT – isotiocianato de tetraetilrodamina  
Triton X-100 – t-octilfenoxipolietoxietanol  
UV – ultravioleta  
Wnt – família de genes de vertebrados homólogos ao fator de crescimento  
Wingless de *Drosophila*

**LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Actina e proteínas associadas _____   | 02 |
| Figura 2 – Distribuição de IFs de desmina em tipos musculares _____  | 03 |
| Figura 3 – Associações de IFS de desmina e estruturas musculares _____   | 06 |
| Figura 4 – Organização de um sarcômero _____   | 12 |
| Figura 5 – Tipos de fibras musculares _____  | 19 |
| Figura 6 - Modelo biológico: Peixes-zebra adultos _____  | 21 |
| Figura 7 – Mitocôndrias, retículo e túbulos T observados por MET _____   | 38 |
| Figura 8 – Mitocôndrias (próximas às miofibrilas) _____  | 40 |
| Figura 9 – Detalhes de mitocôndrias (observados por MET _____  | 43 |
| Figura 10 – Núcleo e miofibrilas associadas _____  | 45 |
| Figura 11 – Núcleo e provável célula satélite no músculo do peixe _____  | 46 |
| Figura 12 – Miofibrilas: pontes cruzadas do complexo actina-miosina _____  | 49 |
| Figura 13 – Esquema do complexo protéico actina-miosina _____  | 50 |
| Figura 14 – Mitocôndrias (coloração verde janus e observação por MO) _____   | 51 |
| Figura 15 – Núcleos e bainhas endomisiais no músculo do peixe _____  | 53 |
| Figura 16 – Periodicidade de miofibrilas do peixe _____  | 54 |
| Figura 17 – SFB, albumina humana e leite são eficazes no controle de marcações inespecíficas de anticorpos secundários _____ | 56 |
| Figura 18 – Controles de autofluorescência: PBS, Bórax e NH <sub>4</sub> Cl _____  | 57 |
| Figura 19 – Desmina é localizada na linha Z do sarcômero _____   | 61 |
| Figura 20 – Periodicidade de estriações: desmina _____   | 61 |
| Figura 21 – Tropomiosina integra a banda I do sarcômero _____  | 63 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 22 – Periodicidade de estriações: tropomiosina _____                                   | 63 |
| Figura 23 – Troponina T é localizada na banda I do sarcômero _____                            | 66 |
| Figura 24 – Periodicidade de estriações: troponina T _____                                    | 66 |
| Figura 25 – Titina é localizada nas áreas de junções das bandas A e I _____                   | 68 |
| Figura 26 – Periodicidade de estriações: titina _____   | 68 |
| Figura 27 - Nebulina é expressa próxima ao septo, sarcolema e no meio da fibra muscular _____ | 71 |
| Figura 28 – Periodicidade de estriações: nebulina _____                                       | 71 |
| Figura 29 – Alfa-actinina é identificada na linha Z _____                                     | 73 |
| Figura 30 – Periodicidade de estriações: alfa-actinina _____                                  | 73 |
| Figura 31 – Miosina tipo II é localizada na banda A do sarcômero _____                        | 75 |
| Figura 32 – Periodicidade de estriações: miosina tipo II _____                                | 75 |
| Figura 33 – Isoforma rápida de miosina tipo II é identificada na banda A _____                | 76 |
| Figura 34 – Periodicidade de estriações: miosina rápida _____                                 | 76 |
| Figura 35 – Fibras musculares (corte semi-fino ) observadas por MO _____                      | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Constituintes dos filamentos intermediários _____             | 04 |
| Tabela 2 - Anticorpos primários_____                                    | 27 |
| Tabela 3 - Anticorpos secundários_____                                  | 28 |
| Tabela 4 - Sondas fluorescentes_____                                    | 28 |
| Tabela 5 – Proteínas identificadas no tecido muscular do peixe-zebra __ | 81 |

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| Resumo   | ix   |
| Abstract   | x    |
| Lista de Abreviações                                       | xi   |
| Lista de Figuras   | xiii |
| Lista de Tabelas   | xv   |
| I - Introdução   | 1    |
| 1. Citoesqueleto   | 1    |
| 2. Citoesqueleto do músculo                                | 7    |
| 3. Miofibrilas e sarcômero                                 | 11   |
| 4. Miogênese   | 14   |
| 5. Tipos de fibras musculares                              | 17   |
| 6. O peixe-zebra como modelo                               | 21   |
| 7. Justificativa   | 22   |
| II – Objetivo Geral  | 23   |
| III - Materiais e Métodos                                  | 24   |
| 1. Reagentes   | 24   |
| 2. Manunção dos peixes                                     | 24   |
| 3. Obtenção de cortes congelados do peixe-zebra            | 25   |
| 4. Microscopia de campo claro                              | 26   |
| 5. Anticorpos e padronização de diluições                  | 28   |
| 6. Microscopia de imunofluorescência                       | 29   |
| 7. Aquisição e processamento de imagens MO e fluorescência | 31   |
| 8. Microscopia eletrônica de transmissão                   | 32   |
| 9. Aquisição e processamento de imagens MET                | 35   |
| 10. Análise morfométrica                                   | 35   |
| IV - Resultados  | 37   |
| V - Discussão  | 82   |
| VI - Conclusões  | 91   |
| VII - Perspectivas   | 93   |
| VIII - Bibliografia  | 94   |

# I - INTRODUÇÃO

## 1. Citoesqueleto

O citoesqueleto é formado por uma rede de filamentos de proteínas que são encontrados principalmente no citosol das células eucarióticas. Tais filamentos protéicos são formados por subunidades e originam na célula uma ultra-estrutura que determina não somente a forma celular, mas também a disposição de organelas. As células podem promover uma organização rápida de suas estruturas pela dissociação de filamentos em uma determinada região ou pela re-associação em uma outra região demonstrando que o citoesqueleto é mais dinâmico do que o seu nome sugere (Alberts *et al.*, 2004). O citoesqueleto relaciona-se com organelas subcelulares, bem como com a membrana plasmática, através de proteínas acessórias específicas. Por meio desse arranjo subcelular é possível identificar funções do citoesqueleto referentes à mobilidade da célula, ao tráfego de organelas, a divisão do ciclo celular, entre outras. Os filamentos de proteínas do citoesqueleto são: os microfilamentos, os filamentos intermediários e os microtúbulos (Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2004).

### 1.1. ACTINA

A actina é uma proteína que possui peso molecular de 43 kDa e que pode formar filamentos medindo entre 5 e 7 nm de diâmetro. Estruturalmente, cada monômero de actina globular (actina-G) expõe sítios de ligação com mais dois monômeros, formando um trímero e que polimerizar-se-ão, formando a actina

filamentosa (também chamada de actina-F ou microfilamento (Figura 1)). Os filamentos de actina têm características de géis semi-sólidos e, podem organizar-se de diversas formas (em feixes, redes, entre outras). As principais isoformas da actina são a alfa, a beta e a gama, e as três podem ser encontradas no músculo esquelético. A alfa-actina se localiza em regiões sarcoméricas e as isoformas beta e gama em áreas subcorticais. No músculo, as proteínas associadas aos microfilamentos são a miosina II, as troponinas, a titina, a nebulina, a vinculina, a paxilina, a distrofina, a plectina, entre outras (Cooper & Schafer, 2000).

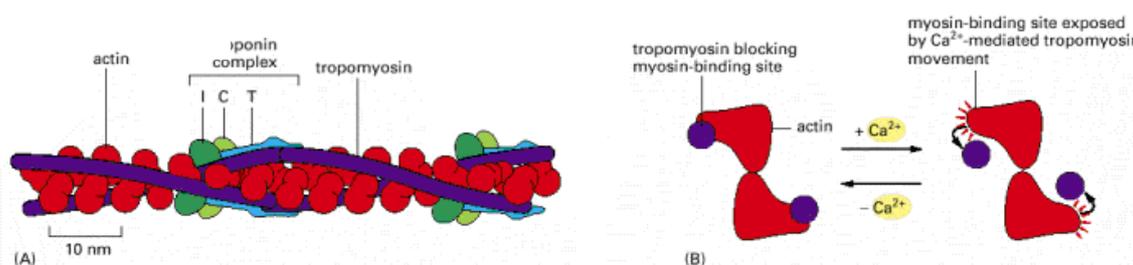


Figura 1 – Actina e proteínas associadas (Alberts, 2004).

Os microfilamentos são importantes para diversas funções celulares, sendo responsáveis pela caracterização do formato da célula, permitindo não somente o suporte mecânico, como também garantido a contração muscular, a movimentação da superfície da célula (adesão por meio das projeções da superfície), colaborando para os processos de migrações da célula, internalização de partículas e a divisão celular (Clark *et al.*, 2002).

## 1.2. FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Os filamentos intermediários (IF) têm papel importante na configuração estrutural das células eucarióticas, garantindo não somente a base de suporte mecânico das células e dos tecidos, mas também o posicionamento de algumas organelas como as mitocôndrias e o núcleo. A superfamília dos filamentos intermediários é formada por 65 tipos distintos de proteínas. Os IF são constituídos por dímeros que possuem domínios centrais antiparalelos e que se associam, formando tetrâmeros. Por meio das terminações dos tetrâmeros são formados os protofilamentos, os quais se unem lateralmente para formar um filamento, conforme revisado por Costa *et al.*, (2004), de acordo o modelo mostrado na Figura 2, representando a distribuição de desmina em tecidos musculares.

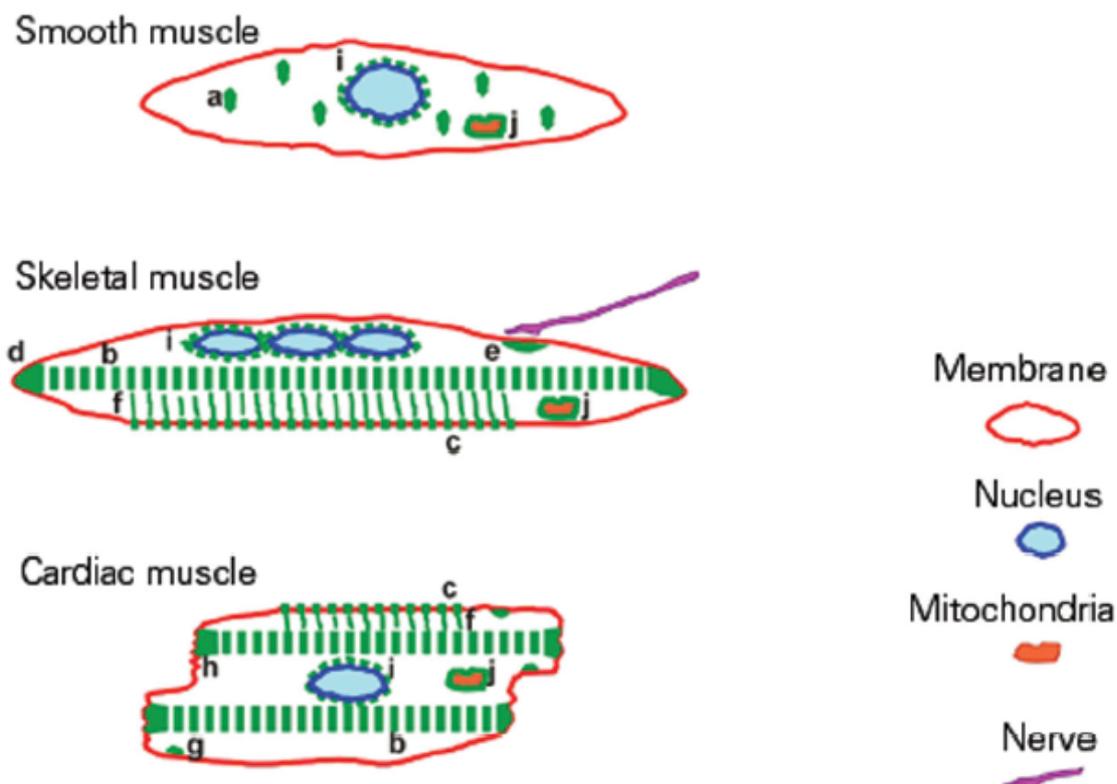


Figura 2 – Distribuição de filamentos intermediários de desmina em tipos musculares liso, esquelético e cardíaco (Costa *et al.*,2004).

Estruturalmente, os filamentos intermediários têm diâmetro aproximado de 10 nm e são constituídos por várias proteínas (ver Tabela 1), as quais são expressas em diversos tipos celulares, cuja distribuição ocorre radialmente, a partir da membrana e em direção ao núcleo.

| Tipo | Proteína   | Peso (kDa) | Local de expressão   |
|------|--|------------|--|
| I    | Queratinas ácidas (Aproximadamente 15 proteínas)             | 40-60      | Célula epitelial   |
| II   | Queratinas básicas ou neutras (Aproximadamente 15 proteínas) | 50-70      | Célula epitelial   |
| III  | Vimentina  | 54         | Fibroblastos, leucócitos, células de músculo liso e outros tipos celulares |
| IV   | Desmina  | 53         | Células musculares   |
|      | Proteínas ácidas do filamento glial                          | 51         | Células gliais   |
|      | Periferina   | 57         | Neurônio periférico  |
|      | Proteínas dos neurofilamentos                                |            |  |
|      | NF-L   | 67         | Neurônios  |
|      | NF-M   | 150        | Neurônios  |
| V    | NF-H   | 200        | Neurônios  |
|      | Alfa-internexina   | 66         | Neurônios  |
|      | Laminas nucleares A,B e C                                    | 60-75      | Lâmina nuclear de todo tipo celular  |
| VI   | Nestina  | 200        | Células pluripotentes do sistema nervoso central                           |

Tabela 1 – Principais constituintes dos filamentos intermediários, seus pesos moleculares e suas distribuições celulares (Cooper, 2000).

As proteínas dos filamentos intermediários têm sido classificadas com base no estudo da seqüência de seus aminoácidos (Tabela 1). São conhecidos seis tipos protéicos, dos quais os dois primeiros (I e II) são caracterizados pelas queratinas – expressas em células epiteliais. A vimentina, encontrada nos fibroblastos, nas células de músculo liso e nos glóbulos brancos, assim como a desmina, fazem parte do tipo III. As proteínas de filamentos intermediários encontrados em neurônios adultos são denominadas neurofilamentos (tipo IV), enquanto a proteína alfa-internexina é expressa durante a neurogênese, ou seja, em um estágio inicial do desenvolvimento do sistema nervoso. Já as proteínas do tipo V, são as laminas nucleares que podem ser observadas integrando o envelope nuclear. Encontrada em células-tronco do sistema nervoso central, bem como durante seu desenvolvimento inicial, a nestina é uma proteína do tipo VI. As proteínas associadas dos IF são a plectina e a sincoilina.

A desmina é uma proteína exclusiva e característica dos três tipos de músculo (liso, esquelético e cardíaco). É expressa desde os estágios iniciais da miogênese, onde inicialmente ela se apresenta na forma de uma rede densa de filamentos em mioblastos, mas vai aparecendo de maneira mais difusa à medida que a célula se diferencia (Costa *et al.*, 2002). Após a formação da estriação das miofibrilas, em células esqueléticas maduras (miotubos), a desmina se associa às linhas Z nos sarcômeros, as mitocôndrias, aos núcleos e ao sarcolema (Figura 3), demonstrada a seguir:

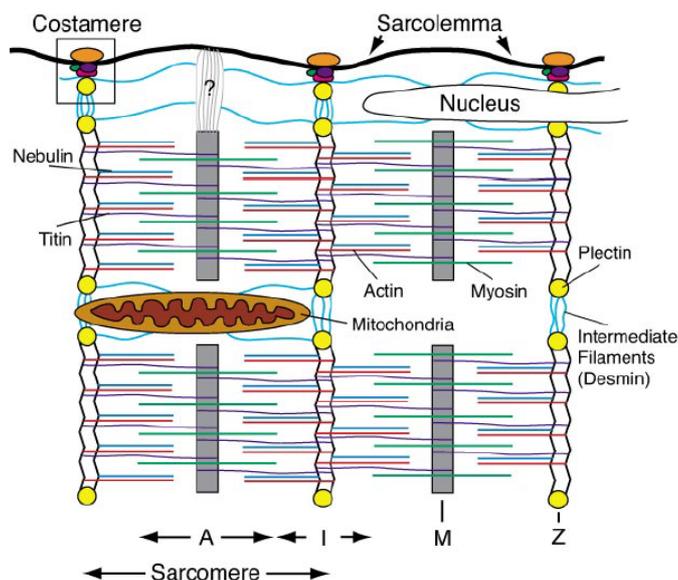


Figura 3 – Associações entre os filamentos intermediários de desmina (em azul) e estruturas musculares, como o núcleo, as mitocôndrias, o sarcolema e o sarcômero (Carlsson & Thornell, 2001).

### 1.3. MICROTÚBULOS

Os microtúbulos são formados por cilindros ocos de 25 nm de diâmetro e estão em constante processo de polimerização e despolimerização. Os microtúbulos são constituídos por uma proteína globular denominada tubulina, que possuem os monômeros alfa- e beta-tubulina, ambos com 55 kDa. Os monômeros de tubulina se unem formando hetero-dímeros alfa-beta-tubulina, que por sua vez se unem a outros dímeros formando protofilamentos, os quais são organizados cilíndricamente. Os microtúbulos participam de uma série de funções celulares, como do tráfego intracelular de vesículas e organelas, da separação dos centríolos durante a divisão celular (mitose), da composição dos cílios e

flagelos e da mudança da forma celular (revisado por Cooper, 2000; Small *et al.*, 2003).

Segundo Clark *et al.* (2002), no músculo, os microtúbulos estão posicionados junto às miofibrilas, ao sarcolema, ao núcleo e ao aparelho de Golgi. Os mesmos autores sugerem que os microtúbulos participam da integração de várias organelas no músculo estriado durante a miogênese. Microtúbulos parecem ser essenciais para o desenvolvimento do músculo, visto que a ineficiência da regulação dinâmica entre microtúbulos e as miofibrilas podem ser preditivos para o crescimento de câncer ou distúrbios no desenvolvimento de células musculares (Fernandez *et al.*, 2002).

## 2. O citoesqueleto do músculo

Há três tipos diferentes de células musculares: a estriada cardíaca, a estriada esquelética e a lisa. As células musculares cardíacas (cardiomiócitos), que constituem os músculos cardíacos, cujas contrações involuntárias, rítmicas, vigorosas e contínuas garantem o influxo/efluxo de sangue pelas câmaras cardíacas, sendo sua atividade contrátil intrinsecamente miogênica, estimulada e propagada com ritmo e intensidade modificados pelo sistema nervoso autônomo. Possuem núcleo único e central, suas fibras estriadas são mais curtas e ramificadas e as células são unidas por meio de junções celulares complexas (os discos intercalares). O músculo liso caracteriza-se pela contração involuntária (estimulada pelo sistema nervoso autônomo), tônica sustentada, menos vigorosa e mais lenta que a contração dos músculos estriados, garantindo os movimentos

involuntários da bexiga, esôfago, intestinos, entre outros órgãos do corpo. Apresentam fibras fusiformes, simples ou aglomeradas, pequenas e sem estriações – núcleo único central, assim como o músculo cardíaco. O músculo estriado esquelético tem contração voluntária (estimulada pelo sistema nervoso somático) que permite ao organismo o controle de seus movimentos (revisado por Moore, 2007).

O músculo estriado esquelético possui um complexo aparato ultra-estrutural para sua atividade contrátil. A fibra muscular (ou célula muscular) é uma estrutura cilíndrica, muito longa e limitada por uma membrana plasmática (sarcolema), que envolve numerosos núcleos, mitocôndrias e miofibrilas. Os múltiplos núcleos situam-se periféricamente a fibra, imediatamente abaixo do sarcolema. As células musculares se mantêm aderidas à matriz extracelular através de sua interação com a lamina basal. No tecido muscular do peixe-zebra (*Danio rerio*), o tecido conjuntivo se apresenta sob a forma de chevrons (“V”) localizados entre miótomos de fibras musculares (Costa *et al.*, 2002).

Dentro do sarcoplasma encontram-se numerosas miofibrilas compostas de filamentos de actina, filamentos de miosina e proteínas acessórias (como a troponina, a tropomiosina, a titina, entre outras), que encontram-se bastante organizadas formando o sarcômero e determinando a sua aparência rica em estriações transversais (Carlsoon & Thornell, 2001). Eventos bem coordenados entre os componentes do citoesqueleto, do sarcolema, e da matriz extracelular estão implicados na atividade contrátil (Clark *et al.*, 2002).

A miosina forma os filamentos grossos, atuando em associação com os filamentos finos de actina durante a atividade contrátil (Vale & Milligan, 2000). A miosina de músculo esquelético é a miosina do tipo II, que é uma proteína grande de cerca de 500 kDa formada por duas cadeias pesadas (200 kDa) e dois pares de cadeias leves (20 kDa). As cadeias pesadas são idênticas e possuem uma cauda comprida e uma cabeça globular, que contém a atividade ATPásica. As cadeias pesadas possuem isoformas específicas (MHCIIa, MHCIIx, MHCIIb) de cada tipo de fibra muscular, as quais são reguladas fisiologicamente (revisado por Sellers 2000; Reggianni *et al.*, 2000). A estrutura e a função da miosina têm sido atribuídas aos elementos essenciais geradores, independentes, de força no músculo (Huxley, 2000a). A distribuição de isoformas tipo IIA é mais abundante em fibras mais profundas do que aquelas encontradas em fibras musculares mais superficialmente (Rivero *et al.*, 1999), caracterizando o padrão de tipos de fibras rápidas e lentas, mas a modulação funcional é discutível e exige melhor investigação (Kubis *et al.*, 1997).

Titina (Figura 4B) é uma proteína gigante (2700 kDa), cuja estrutura é intrinsecamente associada à estruturação e à estabilidade do sarcômero, distribuindo-se da linha M até a linha Z (Ma & Wang, 2006), sendo a interação através de sítios de ligação existentes entre a miosina e a titina, importantes para o alinhamento dos filamentos grossos (Clark *et al.*, 2002). A falta de interação entre os domínios da titina e miosina provocam defeitos severos e morte em animais (Yang *et al.*, 2001).

Nebulina é uma espécie de “proteína molde” que regula o comprimento dos filamentos de actina nos sarcômeros (Figura 4). Esta proteína se estende de uma linha Z até o final do filamento de actina próximo à linha M do sarcômero, determinando o comprimento do filamento de actina. A regulação do comprimento do filamento é sensível à presença da proteína tropomodulina e a própria dinâmica dos filamentos de actina, como sugerem Fowler e colaboradores (2006). As interações entre a nebulina, tropomiosina e troponina parecem influenciar a atividade contrátil, interferindo assim na modulação entre os filamentos do complexo actina-miosina (Ogtu *et al.*, 2003).

Tropomiosina (37 kDa) é uma proteína estrutural associada à actina, sendo identificada uma variedade de isoformas em humanos e em ratos. Além de estabilizar e aumentar a rigidez de filamentos finos, modelos experimentais bem estabelecidos demonstram que a tropomiosina regula, juntamente, com as troponinas as interações existentes entre os filamentos finos e grossos (Craig & Lehman, 2001). Os domínios externos dos filamentos finos do músculo em repouso mantém interação com a tropomiosina, impedindo a ligação da miosina à actina. A atividade ATPásica da miosina, dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , permite não somente o translocamento da tropomiosina, mas também resulta em fortes interações entre os filamentos finos e grossos (Lehman *et al.*, 2000).

Troponina, proteína regulatória, específica do músculo e associada à actina pode ser encontrada em um complexo coordenado por três subunidades diferentes: Troponina C, Troponina I e Troponina T . Troponina C (TnC, 18 kDa) associa-se aos íons divalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , e a mutação em humano tem sido causa

de defeitos cardíacos. (Hofmann *et al.*, 2001). Já a Troponina I (TnI, 20 kDa), liga-se ao sítio de interação dos filamentos grossos impedindo a contração. (Lehman *et al.*, 2001). Troponina T (TnT, 30 kDa) tem papel na organização molecular do complexo regulatório de filamentos finos. TnT codifica diversas isoformas, incluindo aquelas encontradas em músculos rápidos, lentos e cardíacos, sendo recrutada para modular o desenvolvimento e/ou ativação de força. (Hernandez *et al.*, 2001).

Alfa-actinina, proteína de 97 kDa, é o maior componente protéico da linha Z, associada à actina em fibras de stress de células em cultura, nas linhas Z de células de músculo estriado, (Sanger & Sanger, 2002), associada em complexos juncionais integrando proteínas do citoesqueleto à membrana (Flick & Konieczny, 2000) e ligada a outras proteínas reforçando sua característica de proteína de associação. Possui domínio globular de conjugação à actina, extremidades em forma de bastão, sendo suas isoformas específicas de músculo estriado, bem como outras de células não musculares.

### 3. Miofibrilas e sarcômeros

Através do microscópio eletrônico, as miofibrilas do músculo esquelético são vistas sendo divididas transversalmente em unidades periódicas. Estas unidades são os sarcômeros (Figura 4), constituídos principalmente por filamentos protéicos de actina e de miosina. Estudos por meio de luz polarizada permitiram estabelecer em cortes longitudinais alteração do nível de tonalidade das bandas dos sarcômeros, determinando assim o seu aspecto de estriações transversais

claras e escuras. As mais claras são conhecidas como isotrópicas (bandas I) e as mais escuras são denominadas anisotrópicas (bandas A). A linha Z, fina e densamente corada separa e delimita cada Banda I (Huxley & Neidergerke, 1954; Huxley & Hanson 1954, Moore *et al.*, 1956). Os sarcômeros podem ser divididos em: bandas I, bandas A, linhas Z e linha M.

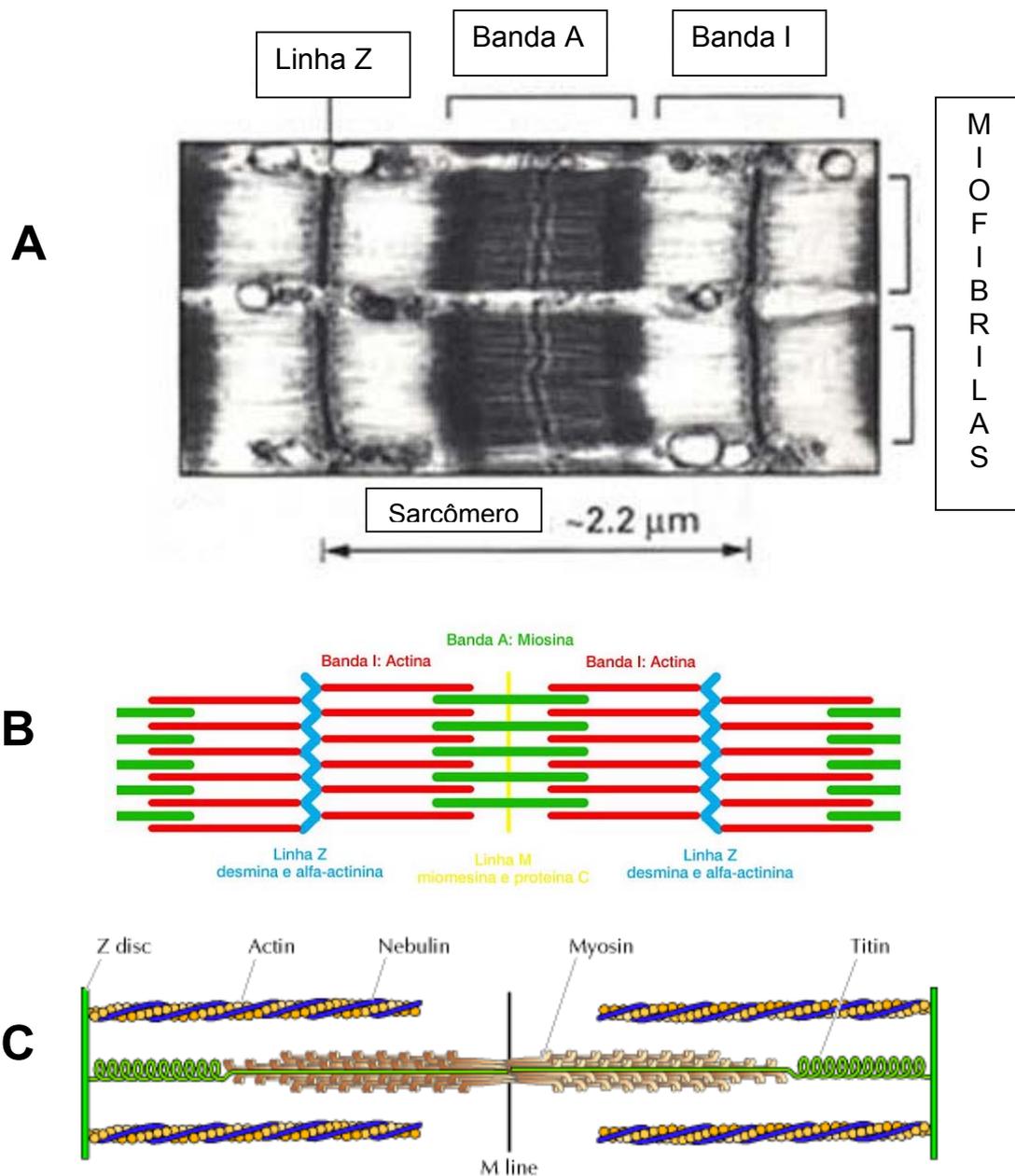


Figura 4 – (A) Organização de um sarcômero em bandas I, bandas A, linhas Z e linha M. (B) Distribuição das proteínas actina, miosina, nebulina e titina em um sarcômero, (A) adaptado de Alberts, 2004; (B) Labmus; (C) Cooper, 2000).

Os filamentos de actina (ou microfilamentos) formam as bandas I e se ligam em uma extremidade do sarcômero a uma linha Z e na outra extremidade se associam aos filamentos de miosina (Figura 4). Os filamentos de miosina, por sua vez, formam a banda A, sendo que na linha M (que fica no meio do sarcômero) são encontradas apenas as caudas das moléculas de miosina – local onde os filamentos adjacentes de miosina permanecem unidos. Ishikawa (1983) documentou o arranjo altamente organizado do aparato protéico, bem como sua distribuição bem regular em cortes transversais. Em seus estudos, foi estabelecido o modelo teórico dos filamentos deslizantes.

Os limites do sarcômero encontram-se nas linhas Z, região onde existe abundância de proteínas como a actina, a desmina, a alfa-actinina e outras como a plectina. Além das bandas A e I e das linhas Z e M, existe também a zona H, que é uma região onde se encontram filamentos de miosina, mas onde os filamentos de actina não penetram.

Nos sarcômeros existem três sistemas de filamentos protéicos: os filamentos finos formados de actina, os filamentos grossos constituídos de miosina, e os filamentos elásticos formados pelas proteínas titina e nebulina. A titina (2700 kDa) e a nebulina (500 kDa) são proteínas com propriedades elásticas e estão relacionadas à manutenção e a estabilidade do complexo de contração actina-miosina (Centner *et al.*, 2000; Huse *et al.*, 2002; Fowler *et al.*, 2006).

A organização e comprimento dos filamentos, assim como os espaçamentos no sarcômero são controlados por proteínas acessórias. As proteínas CapZ (36-32 kDa) e alfa-actinina (110 kDa) controlam as extremidades (+) dos filamentos de actina que ficam ancorados na linha Z, e a tropomodulina (40 kDa) faz o capeamento nas extremidades (-) dos microfilamentos (Cox *et al.*, 2001; Carlson & Thornell, 2004).

Outras proteínas acessórias como as troponinas T, I, C e tropomiosina, dependentes de cálcio, de magnésio e de ATP, controlam a atividade contrátil do músculo. O complexo protéico troponina I-T se liga à tropomiosina e à actina impedindo a ligação dos filamentos de actina às cabeças de miosina, evitando assim a interação dos filamentos e, conseqüentemente, o surgimento de força. Estimulada pelo aumento da concentração de cálcio, a troponina C se desliga da actina, liberando-a para interagir com a miosina e produzir contração.

Vários sarcômeros unidos em série formam as miofibrilas, que por sua vez ficam localizadas dentro de uma célula muscular (ou fibra muscular). As células musculares são formadas ao longo de uma série de eventos sequenciais que vão do aparecimento de células mononucleadas (mioblastos) até a fusão destas gerando longas células multinucleadas (miotubos), no processo chamado de miogênese.

#### 4. Miogênese

Apesar de muito estudada, a miogênese (determinação e formação da fibra muscular) é ainda alvo de controvérsias, mas entre os diferentes estágios de

diferenciação das fibras musculares há um consenso de que os precursores dos miócitos são células mesenquimais embrionárias dos miótomos de um somito, desenvolvidas a partir do mesoderma (Gilbert, 2000).

Cada parte típica do miótomo de um somito apresenta uma divisão epaxial e dorsal, e outra hipoaxial e ventral. Estudos mostraram que duas linhagens distintas de células precursoras originam em mamíferos os brotos dos membros, as quais se originam dos somitos em resposta a sinais que partem dos tecidos próximos (Brand-Saberi *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2006).

A primeira etapa da miogênese é o estado de comprometimento (determinação) dos pré-mioblastos replicantes originados dos somitos do embrião à partir da notocorda. Ocorre a indução, por sinais químicos, de células do dermomiótomo – o somito dorsal que se encontra abaixo do ectoderma (somito hipoaxial), as quais são estimuladas por moléculas Wnt. (Rudnicki *et al.*, 2005).

Mioblastos epaxiais são estimulados por Wnt (Wnt 1) e Shh (*Sonic hedgehog*), cuja estimulação resulta na expressão de Myf5 em combinação com Wnt7a, BMP4 e Noggin, levando a expressão gênica do MyoD (revisado por Cossu e Borello, 1999; Buckingham, 2006).

Os mioblastos pós-replicantes migram induzidos pela expressão gênica de Myf5 e MyoD (Zhang *et al.*, 1999; Rudnicki *et al.*, 2004). Segundo Li e colaboradores (1999), a migração é facilitada pela diminuição da expressão de beta-integrinas e, portanto de sua interação com outras proteínas, pela diminuição de N-caderina na superfície celular do mioblasto, pelas ativações protéicas de FAK (cinase de adesão focal) e paxilina (Quacha & Rando, 2006), cujas atividades protéicas contribuem para a formação de contatos focais, imprescindíveis para o

movimento de migração. Estes eventos são controlados pela ativação de vários genes reguladores e pela expressão da família MyoD de fatores de transcrição do tipo hélice-alça-hélice básicos (bHLH) específicos de músculo ou MRFs (fatores regulatórios miogênicos) nas células miogênicas precursoras (Zhang *et al.*, 2005). Nos vertebrados, a família de MRFs inclui MyoD, Myf5, miogenina e MRF4, que estão envolvidos na diferenciação muscular (Zhang *et al.*, 2005). Todos estes fatores atuam de forma combinada, fornecendo ao mioblasto uma memória de seu estado comprometido, e regulando a expressão de outros genes que garantem a célula muscular seu fenótipo especializado (Alberts *et al.*, 2004).

Como resultado deste processo, mioblastos se reconhecem, se agregam, se diferenciam e se alinham, ocorrendo a fusão célula-célula homotípica (Petruzelli, 1999), e formando estruturas alongadas, multinucleadas e cilíndricas (os miotubos). Os miotubos alongam-se por fusão dos mioblastos nas suas extremidades e regiões laterais. No sarcoplasma destas células, organizam-se as miofibrilas que expressam proteínas específicas como a  $\alpha$ -actinina, a titina e a miosina do tipo II. À medida que mais sarcômeros são acrescentados aos já existentes, os núcleos são deslocados para a periferia e a organização sarcomérica torna-se evidente, bem como as formações do retículo sarcoplasmático e túbulos transversos, originando a tríade muscular (Sanger & Sanger, 2002).

Algumas células mantêm a capacidade regenerativa no músculo esquelético maduro: as células satélites. Estas células são mantidas como reserva em um estado quiescente na forma de células pequenas, achatadas e inativas que, em contato íntimo, revestem as células maduras e estão contidas dentro de

uma lâmina basal. Elas são as células-tronco do músculo esquelético adulto, as quais podem ser estimuladas à proliferação, podendo reparar o tecido, quando ativada a sua progênie, resultado da fusão célula-célula (Alberts *et al.*, 2004). Assim, as células satélites estão implicadas como fonte principal celular no reparo da fibra muscular madura (Goldring *et al.*, 2002).

## 5. Tipos de fibras musculares

As células musculares podem alterar suas propriedades fisiológicas, modificando as isoformas das proteínas que possuem. O processo da miogênese permite a fibra músculo-esquelética crescer, amadurecer e modular suas características conforme as peculiaridades funcionais. O genoma da célula muscular contém genes que codificam proteínas características da célula músculo-esquelética, e os transcritos de RNA de muitos desses genes podem ser modificados. Na medida em que a fibra muscular se desenvolve, são produzidas isoformas diferentes, adaptadas as mudanças na rapidez, força e resistência necessárias, podendo levar a geração de fibras musculares com significativas diferenças (Alberts *et al.*, 2004). A determinação do tipo de fibra muscular segundo modelo proposto por Esser e colaboradores (1999), estabelece que as fibras do tipo II são resultantes do estado predeterminado, e as fibras do tipo I são variações (pela ativação de isoformas proteicas) da primeira. As fibras musculares podem ser classificadas em fibras vermelhas, de contração lenta (tipo I); brancas, de contração rápida (tipo IIA) e intermediárias (tipo IIB), entre outras. As fibras do tipo I, vermelhas ou de contração lenta (de oxidação lenta), levam

aproximadamente 75 milisegundos para completar sua contração. São vermelhas por causa da grande quantidade de mioglobina (pigmento armazenador de oxigênio semelhante à hemoglobina), e podem sofrer contração repetitiva extensa sem fadiga, sendo seu sarcoplasma rico em mitocôndrias. Estruturalmente, suas fibras contêm mais glicogênio, tendem a ser mais estreitas do que as fibras do tipo II, possuem linhas Z e M mais espessas, junções neuromusculares menos extensas, suprimento vascular mais denso, e demandas de oxigênio mais acentuada (Eisenberg & Milton, 1984; Yan *et al.*, 2001). As fibras do tipo I aparecem caracteristicamente nos músculos posturais, que precisam ser firmes.

Estudos recentes apontam que os genes precursores de músculos lentos e rápidos no peixe-zebra ocupam uma região distinta na zona marginal no estágio da gástrula (Westerfield & Ochi, 2007). A proteína Hedgehog influencia o desenvolvimento de fibras musculares de contração rápida no peixe-zebra (Patton *et al.*, 2007).

Em um corte de tecido muscular, vários tipos de fibras musculares esqueléticas, cada um com tipos diferentes de isoformas protéicas e propriedades da atividade contrátil diferentes, podem ser visualizados lado a lado.

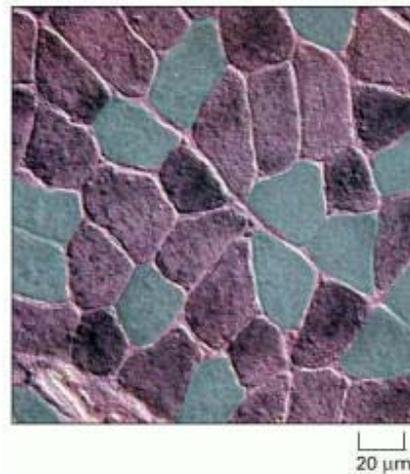


Figura 5 – Corte transversal de músculo esquelético de perna de camundongo adulto, corados com anticorpos distintos, cada um para uma isoforma específica da cadeia pesada da proteína miosina II. Pode-se verificar a presença de três diferentes tipos de fibras musculares: lentas (rosa), rápidas (cinza) e intermediárias (roxo) (Hughes *et al.*, 1999).

Já as fibras do tipo II, de contração rápida, podem contrair-se em apenas 25 milissegundos. Duas classes são distinguidas nas fibras do tipo II: tipo IIA (fibras oxidativas rápidas e glicolíticas ou intermediárias) e tipo IIB (fibras glicolíticas rápidas), as quais são dependentes da glicólise. As fibras do tipo IIA obtêm energia da glicólise, bem como da fosforilação oxidativa, possuindo mais mitocôndrias e são mais resistentes à fadiga do que as fibras do tipo IIB. As fibras do tipo II parecem dominar os músculos não-posturais dos membros, sendo capazes de gerar forças poderosas sobre um período relativamente curto. Essa predominância parece variar dentro de uma população, durante o desenvolvimento e a velhice (Sirca & Kostevc, 1985; Larsson, 1978).

Várias proteínas musculares, como a miosina e a troponina, evoluíram em isoformas “tipo-específicos” de fibras rápida e lenta. O significado funcional da

existência de diferentes isoformas de troponina em diferentes tipos de fibras rápidas e lentas não é inteiramente compreendido. Fibras que contêm a isoforma de troponina lenta parecem ter uma sensibilidade mais elevada ao cálcio do que aquelas fibras rápidas, as quais possuem a isoforma de troponina rápida.

É bem documentado que as atividades enzimáticas das moléculas de miosina existentes nestes diferentes tipos de fibras são distintas e dependem das atividades ATPásicas presentes nas cabeças destas moléculas. Estas atividades ATPásicas variam conforme o pH, os níveis de ATP e pela presença de cálcio (Clark *et al.*, 2002). As fibras de contração muscular lenta e rápida do músculo esquelético em vertebrados expressam diferentes isoformas de miosina. Estas diferentes isoformas possibilitam não somente velocidades diferentes da atividade contrátil, bem como alterações de força e resistência à fadiga (revisado por Brotto *et al.*, 2006).

Estas variações podem ser causadas também pela secreção de um fator trófico neural. Mas, estudos subsequentes indicam que o tipo de fibra muscular é determinado primariamente pela frequência da atividade neural no seu axônio (Riley & Allin, 1973). Maxwell e colaboradores (1973) demonstraram que a predominância das fibras musculares do tipo IIA também é afetada pelo treinamento físico, permitindo ao músculo mais resistência à fadiga.

## 6. O peixe-zebra como modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido bastante estudado nos últimos anos (Figura 6), no entanto, alguns aspectos para melhor caracterização da organização de miofibrilas no músculo esquelético de peixe-zebra adulto ainda não foram estudados. Vários pesquisadores começaram no final dos anos 80 a utilizar o modelo do peixe-zebra para estudar o desenvolvimento embrionário dos vertebrados.



Figura 6 – Peixes-zebra adultos com cerca de 5 cm cada.

O peixe-zebra tem sido usado como modelo de pesquisa por vários motivos, descritos a seguir. O embrião do peixe-zebra tem desenvolvimento fora do útero materno e não exige intervenções delicadas e ambientes estéreis para sua observação, como é o caso dos embriões de galinha ou de camundogo. Ele possui rápido crescimento embriológico, e é fácil a sua manutenção em biotérios. As fertilizações podem ser sincronizadas para se obter um grande número de embriões para análises bioquímicas. O peixe-zebra vem assumindo uma liderança no estudo da Biologia do Desenvolvimento devido a sua combinação única de

estudos genéticos e embriológicos. Além disso, constitui em excelente modelo experimental que pode levar ao entedimento de patologias comparadas às humanas, devido à existência de vários mutantes muito bem caracterizados (Dooley 2000). Todos os experimentos realizados nesta dissertação de mestrado utilizando espécimens de peixe-zebra foram aprovados e estão de acordo com as normas determinadas pelo Protocolo de Cuidados com Animais Experimentais em Pesquisas na área Biomédica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## 7. Justificativa

Esse trabalho é particularmente importante para a compreensão da estrutura básica que constitui o músculo esquelético do peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto, uma vez que este modelo de animal vertebrado vem sendo muito estudado nos últimos anos. Estudos como o nosso podem ajudar no entendimento de mecanismos básicos que regulam a miogênese (a formação do músculo) e a miofibrilogênese (a formação das miofibrilas), e desta forma ainda contribuir para um entendimento de patologias musculares, muito estudadas em mutantes do peixe-zebra.

## II - OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é o de estudar a organização de miofibrilas e mitocôndrias no músculo esquelético do peixe-zebra (*Danio rerio*) adulto, tentando, desta forma, entender o envolvimento de proteínas do citoesqueleto durante o desenvolvimento de células musculares.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar a organização de miofibrilas e mitocôndrias no músculo esquelético de peixe-zebra adulto.
- Caracterizar a distribuição do filamento intermediário desmina.
- Caracterizar a distribuição das seguintes proteínas sarcoméricas: troponina T, tropomiosina, miosina tipo II, miosina tipo II rápida, titina, nebulina, alfa-actinina.
- Comparar a distribuição de cada proteína com dados da literatura (peixe-zebra embrião e adulto e outros modelos cultura de células musculares de embrião de galinha).

### III - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Reagentes

- Merck: acetona, NaCl, clorofórmio, metanol e ácido acético, isopentano, citrato de chumbo, Entellan, verde de Janus, cloreto de amônio, bórax
- Reagen: paraformaldeído; NaHPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HCl
- Sakura: OCT (Tissue Tek compound), temperatura crítica ótima
- Sigma: soro fetal bovino, Triton X-100, N-propil Galato, DABCO, glicerol, glutaraldeído, poli-L-lisina, cacodilato de sódio, sacarose, albumina de soro bovino
- Vetec: hidróxido de sódio, azul de toluidina
- Polysciences, Inc.: Resina epon – polybed
- Ted Pella: acetato de uranila, citrato de chumbo, tetróxido de ósmio

#### 2. Manutenção dos peixes-zebra

Após aprovação do uso destes animais foram utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*) selvagens, adultos, procedentes do biotério localizado no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os peixes foram mantidos como população estoque e divididos em vários tanques em que foram separados fêmeas e machos. Os peixes foram mantidos entre 28-30°C, em tanques de água doce e com ciclos de luz-escuro de 14 horas. Um sistema de filtragem de água central mantinha a água dos tanques transparente e inodora, e recebiam, no mínimo, duas refeições diárias.

Os peixes eram mantidos em EGG WATER (água destilada reconstituída com quantidade adequada de sais essenciais) em um volume mínimo de 3 litros. Os tanques eram observados, diariamente, e trocas de água para retirada de detritos eram realizadas, se necessário. Antes de restabelecer o nível normal dos tanques, tamponava-se o pH para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio a 1 M. Para acompanhar a capacidade tamponante da EGG WATER havia aferição diária dos valores de pH de cada um dos tanques e adicionava-se, também, algumas gotas de azul de metileno a 0,01% (um fungicida) visando evitar aglomeração de colônias fúngicas no fundo oriunda, por exemplo, de resquícios de ração. Os níveis de oxigenação da água foram conservados por meio de um sistema de bombeamento de ar.

### 3. Obtenção de cortes congelados do peixe-zebra

#### Etapa 1: Obtenção e congelamento do espécimen

Na tentativa de uma maior preservação ultraestrutural do espécimen, foi realizada a captura de um peixe de cada vez de um dos tanques de água e estes eram submetidos à analgesia por baixa temperatura em freezer (-20 °C) por aproximadamente quinze minutos ou até que o mesmo estivesse hipocinético. Em seguida, os peixes eram submetidos à morte pelo método da guilhotina, seguida de fixação imediata do peixe em paraformaldeído à 4% (tamponado com PBS 1 x pH 7,4) por cinco minutos para manter a boa preservação estrutural do músculo do peixe. Vale ressaltar que outros fixadores, tais como acetona e metanol (-20 °C) foram utilizados, mas estes não

foram efetivos e não resultaram em boa preservação do tecido muscular do peixe. Após a fixação com PFA à 4%, o peixe era colocado em solução de sacarose à 30% por duas horas. A seguir, era utilizado o composto OCT da *Tissue Tek* como meio de inclusão para o congelamento. O material era submetido ao congelamento rápido em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido.

## Etapa 2: Obtenção de cortes de tecido muscular

Utilizou-se o criostato da Leica, modelo CM1850, em sala com temperatura à 16°C. Foi utilizada a navalha de aço, regulando-se a temperatura do criostato para a faixa entre -18 à -20°C. O braço do porta-espécimen foi ajustado para passos de 10 micrômetros, sendo o bloco colocado com OCT no mesmo. A captura de cortes longitudinais do músculo do peixe era realizada com auxílio de um fino pincel, sendo os mesmos distribuídos em lâminas com extremidade fosca e, previamente, preparadas com o adesivo poli-L-lisina. Ao final os blocos, contendo material, eram conservados em freezer a -75°C, para uso futuro.

## 4. Microscopia de campo claro

### 4.1 Coloração com Azul Toluidina

Realizou-se em alguns cortes coloração com azul de toluidina a 1% na diluição 1:2 (azul de toluidina: PBS 1 X), por 30 segundos em temperatura ambiente, lavados em água corrente, secos na placa quente e montados com meio Entellan ®. Observou-se por meio de microscópio óptico a preservação

geral do tecido muscular do peixe como, por exemplo, as estriações sarcoméricas, a presença de septos e núcleos periféricos em uma seqüência de cortes transversais e longitudinais do tecido muscular. Após essa etapa, mais cortes do músculo esquelético do peixe foram obtidos e submetidos as colorações por Hematoxilina (corante básico, que cora componentes ácidos como o núcleo (para evidenciar núcleos), Eosina (um corante ácido, cora componentes básicos como o citoplasma (para evidenciar citoplasma e núcleo), Verde de Janus (para observação de mitocôndrias) e a imunomarcação com anticorpos específicos (para caracterização da distribuição proteica nas estriações transversais sarcoméricas).

#### 4.2. Coloração Hematoxilina-Eosina

Lâminas recobertas com poli-L-lisina e contendo cortes congelados do músculo esquelético do peixe com 10 µm de espessura foram retiradas do freezer a -75° C e deixadas sobre a bancada, por 15 minutos, a fim de que atingissem a temperatura ambiente. Estas eram imersas em solução de álcool a 80% e em solução de álcool absoluto, respectivamente por 5 minutos para a desidratação do espécimen. As lâminas eram imersas em seguida em solução de hematoxilina de Morris por 2 minutos. Nova lavagem era realizada e em seguida os cortes recebiam um banho com eosina durante 1 minuto. Os pequenos fragmentos de músculos contidos nas lâminas eram imersos em becker contendo água acética 2% (ácido acético ou etanóico 1:9ml de água destilada), por 1 minuto para iniciar o processo de desidratação do tecido, garantido a redução da constante isoelétrica e evitando à interrupção das

ligações hidrofílicas. Álcool a 80, 90% e álcool absoluto, respectivamente, durante 5 minutos foram usados na etapa final dessa coloração, quando as lâminas eram montadas com Entellam e visualizadas no microscópio óptico.

#### 4.3. Coloração Verde de Janus

Alguns cortes foram corados com Verde de Janus B a 4% por 1 minuto a temperatura ambiente, e lavados em água corrente, secos em placa quente, montados com meio Entellan e visualizadas em microscópio óptico.

#### 5. Anticorpos e padronização de diluições

| <b>Anticorpos Primários</b>            | <b>Tipo/Feito em</b>     | <b>Diluição Utilizada</b>  | <b>Origem do antígeno</b> | <b>Peso Molecular</b> | <b>Origem Catálogo</b> |
|--|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| anti-troponina T<br>clone: TJLT-12     | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | coelho                    | 39 kDa                | Sigma<br>T-6277        |
| anti-tropomiosina<br>clone: CH1        | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | camundongo                | 36 kDa                | Sigma<br>T-9283        |
| anti-miosina<br>rápida<br>clone: MY-32 | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | coelho                    | 200 kDa               | Sigma<br>M-4276        |
| anti-miosina tipo<br>II (rápida)       | policlonal<br>coelho     | imunofluorescência<br>1:50 | humano                    | 200 kDa               | Sigma<br>M-7523        |
| anti-miosina tipo<br>II (lenta)        | policlonal<br>coelho     | imunofluorescência<br>1:50 | humano                    | 205 kDa               | Sigma<br>M-3913        |
| anti-desmina                           | policlonal<br>coelho     | imunofluorescência<br>1:50 | galinha                   | 53 kDa                | Sigma<br>D-8281        |
| anti-nebulina<br>clone: NB2            | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | galinha                   | 500 kDa               | Sigma<br>N-9891        |

|                                    |                          |                            |         |         |                 |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------|---------|-----------------|
| anti-titina<br>clone: T-11         | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | galinha | 1 MDa   | Sigma<br>T-9030 |
| anti-alfa-actinina<br>clone: EA-53 | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | coelho  | 110 kDa | Sigma<br>A-7811 |
| anti-actina<br>clone: 5CS          | monoclonal<br>camundongo | imunofluorescência<br>1:50 | coelho  | 43kDa   | Sigma<br>A-2172 |

Tabela 2 - Anticorpos primários

| <b><u>Anticorpos Secundários</u></b> | <b>Diluição<br/>Utilizada/Feito em</b> | <b>Origem</b> |
|--------------------------------------|--|---------------|
| anti-IgG de coelho-FITC              | 1:100<br>Cabra                         | Sigma         |
| anti-IgG de camundongo-<br>TRITC     | 1:100<br>Cabra                         | Sigma         |

Tabela 3 - Anticorpos secundários

| <b>Sonda</b> | <b>Afinidade</b> | <b>Diluição<br/>Utilizada</b> | <b>Origem</b>                         |
|--------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| DAPI         | DNA              | 1:2000                        | Molecular Probes<br>(Eugene, OR, EUA) |

Tabela 4 - Sonda fluorescentes

## 6. Imunohistoquímica

Lâminas contendo cortes congelados de músculo esquelético do peixe foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente por quinze minutos. A área ao redor dos cortes de tecido foi delimitada (espécie de poço) com caneta hidrofóbica ou com esmalte. As lâminas eram submetidas a

lavagens para a permeabilização de membranas em solução de PBS 1 X com Triton à 0,25 %, durante dez minutos e por duas vezes. O uso de bloqueio com solução de cloreto de amônio à 50 mM ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), durante uma hora foi indispensável para bloquear grupamentos aldeídicos livres, evitando marcações inespecíficas e diminuindo a autofluorescência. Nova lavagem com solução de PBS 1 X durante cinco minutos por duas vezes foi realizada. Foram realizados experimentos controle somente com os anticorpos secundários (omitindo-se a incubação com os anticorpos primários). Logo após esta etapa, os cortes receberam solução de bloqueio (PBS 1 X + BSA à 2,5 % + Leite desnatado à 2 % + SBF à 8 %) por 24 horas à 4°C, sendo a mesma realizada para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. As lâminas foram então submetidas à nova lavagem, sendo utilizada a solução de PBS 1 X + Triton 0,25%, por duas vezes de cinco minutos cada. Em seguida, os anticorpos primários eram diluídos em PBS 1 X + Triton 0,25 % e incubados nos cortes durante uma hora à 37°C, em câmara úmida com um volume final de 100  $\mu\text{l}$ /poço. A seguir, nova seqüência de lavagem foi realizada (PBS 1 X por 3 vezes de 5 minutos cada), quando os anticorpos secundários foram incubados nas mesmas condições de incubação realizadas com os anticorpos primários (descritas anteriormente). Depois de 3 lavagens (durante 5 minutos cada) com PBS 1 X, e de uma lavagem única em solução de NaCl à 0,9 %, durante 5 minutos, respectivamente, incubou-se os cortes de tecido muscular do peixe com a sonda fluorescente DAPI à 0,1  $\mu\text{g}$ /20 ml em NaCl à 0,9 %, durante 3 minutos, para revelação dos núcleos celulares. As lâminas contendo os cortes foram

montadas, após lavagem rápida com NaCl à 0,9 % com lamínulas de vidro de 25 x 25 mm, utilizando-se como solução de montagem: glicerol à 60 %, PPD à 0,0025 %, N-Propil-Galato à 5 % e DABCO à 0,25 % - sendo o pH ajustado para 7,5.

7. Aquisição e processamento de imagens.

### Etapa 1: Microscopia de campo claro

Todas as lâminas montadas com cortes congelados (colorados com Azul de toluidina, Hematoxilina-eosina e Verde de Janus ou submetidos à imunomarcação), e cortes semifinos (colorados com Azul de toluidina) foram observadas em microscópio óptico invertido do tipo foram observadas em aumentos diferentes em um microscópio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japão). As imagens foram transferidas através da câmera Evolution VF cooled collar (Media Cybernetics, EUA) e digitalizadas através do programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, EUA) e as pranchas foram montadas utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, EUA).

### Etapa 2: Microscopia de fluorescência

As imagens de fluorescência dos cortes incubados com PBS, Bórax e Cloreto de amônio foram adquiridas com os valores de brilho e contraste ajustados no aparelho de aquisição Argus-20, de forma que os mesmos valores fossem mantidos para os canais de emissão de UV, fluoresceína e rodamina. Para cada canal foram utilizados os filtros seletivos apropriados para fluoresceína, rodamina, UV (DAPI) e contraste interferencial de fase. A aquisição das imagens de fluorescência, com filtros específicos para rodamina,

fluoresceína e ultra-violeta, foi possível pelo uso de um processador de imagens Argus-20 (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japão) acoplado à uma câmera CCD modelo C2400 integrada (Hamamatsu, Photonics, Shizuoka, Japão), e enviadas através de uma interface SCSI à um computador Dell Optiplex GX270 (Dell Corporate, Round Rock, TX, EUA). Imagens dos experimentos foram editadas e pranchas foram montadas utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA).

## 8. Microscopia Eletrônica de Transmissão

O arcabouço ultra-estrutural do músculo esquelético do *Danio rerio* adulto foi analisado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Blocos contendo espécimens foram utilizados para a visualização do arranjo estrutural do músculo do peixe-zebra submetidos à ultramicrotomomia, evidenciando as principais características teciduais do espécimen em estudo, além de cortes ultrafinos apresentando espessura entre 500 a 700 angstrons (50-70 nm). As etapas do método são explicadas a seguir:

### Etapa 1: Processamento de material

Peixes adultos de ambos os sexos foram coletados dos tanques e induzidos à morte conforme descrito anteriormente. Após transferência para a capela exaustora, fragmentos de 2mm do músculo esquelético do peixe-zebra foram fixados em solução fixadora de Karnovsky modificada: paraformaldeído a 4%, glutaraldeído a 4 % (diluído em tampão cacodilato de sódio à 0,2 M, pH 7,4), onde os mesmos permaneciam durante uma hora à temperatura de 4°C. Utilizou-se

tampão cacodilato de sódio à 0,1 M (pH 7,4) à 4°C, por 3 vezes seguidas, durante dez minutos cada para lavagem do fixador. Para a pós-fixação, misturados em volumes iguais, utilizou-se tetróxido de ósmio à 2 % diluído em tampão cacodilato de sódio à 0,2 M por uma hora a 4°C. Depois de única lavagem rápida em tampão cacodilato de sódio à 0,2 M, os fragmentos do peixe foram submetidos ao processo de desidratação por meio de trocas seqüenciais, usando as concentrações de acetona 30, 50, 70, 95% em banho único, com duração de quinze minutos cada e à temperatura ambiente. A seguir, os fragmentos foram lavados 3 vezes em acetona à 100 % durante dez minutos cada e à temperatura ambiente. A acetona foi usada para deixar os espécimes livres de água. Depois, a infiltração foi realizada, gradativamente, substituindo-se a mistura de acetona e resina Epon sem catalizador na proporção 2:1 por um período de duas horas. Seguiu-se o uso de uma mistura de acetona e resina sem catalizador (1:1) durante um período de 12 h à temperatura ambiente, com o objetivo de prosseguir com o processo de infiltração. Para a impregnação final utilizou-se resina pura com catalizador por um período de oito horas, sendo desta forma concluída a etapa de infiltração do tecido muscular. O emblocamento do material biológico foi assegurado usando um molde específico (molde de silicone), previamente identificado com número de registro. Os espécimes foram colocados nestes moldes de forma a ficarem bem próximo da extremidade. Moldes contendo espécimes submersos por resina pura foram mantidos por três dias em estufa com temperatura regulada a 60°C, concluindo-se as etapas de processamento do material com a polimerização à alta temperatura.

## Etapa 2: Obtenção e coloração de cortes semi-finos

Após três dias de polimerização, os moldes foram retirados da estufa e os bloquinhos foram recolhidos. Com o auxílio de lixas número 100 para madeira, lâminas de aço e lima, as extremidades dos blocos (contendo material) eram preparadas para a confecção de uma espécie de pirâmide (com formato de trapézio). Assim, o bloco contendo a forma de pirâmide era ajustado no ultramicrotomo (Reichert-Jung). Cortes semifinos com aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  foram realizados através do uso de uma navalha de vidro. Os cortes eram recolhidos ao caírem na água e ficarem flutuando em um pequeno recipiente repleto de água. Os cortes semifinos eram colocados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina 1% e observados em um microscópio óptico.

## Etapa 3: Processamento de material para cortes ultra-finos

Blocos submetidos aos cortes semifinos tiveram seus trapézios demarcados mais uma vez, sendo refeitos após escolha da melhor área de interesse para o estudo. Dessa vez utilizando navalhas de diamante (Diatome, EUA) de tamanho de 2,1 mm, ângulo de corte de 6° e velocidade de 1mm/s. Estes blocos foram submetidos à ultramicrotomia para aquisição de cortes ultra-finos, os quais eram recolhidos com auxílio de uma pinça anti-magnética e coletados em pequenas grades especiais de cobre com malha de 400 *mesh*. A contrastação a foi baseada na utilização do filtrado de acetato de uranila 2%, onde as grades de cobre eram imersas durante 20 minutos. Após esse tempo, o material biológico foi retirado e

lavado em solução de álcool metílico (metanol) com movimentos rápidos, utilizando-se a pinça hidrostática e as grades foram projetadas e imersas em três placas de petri. A etapa final da contrastação negativa foi realizada com citrato de chumbo à 2 % por 5 minutos. Mas, previamente, pequenas placas de cera foram revestidas parcialmente com papel de alumínio e mantidas tampadas. Dentro das placas foram colocadas pastilhas de hidróxido de sódio na tentativa de diminuir a possibilidade de formação de precipitados. Concluídas todas as etapas, as grades foram transferidas para estojo específico, sendo observadas em microscópio eletrônico aproximadamente 48 horas após a conclusão da contrastação.

## 9. Aquisição e processamento de imagens de MET

As grades contendo material contrastado foram transferidas para o porta-espécimen. Os cortes foram observados e eletromicrografias realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1200 EX (Japão) operando em 80 kV, em diferentes aumentos. As imagens foram digitalizadas através de *Scanner* com auxílio do programa Image ProPlus e transferidas para um computador. Algumas imagens foram obtidas no Microscópio Eletrônico Zeiss modelo CEM 900.

## 10. Análise Morfométrica

Imagens de imunomarcações para as seguintes proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto: desmina, alfa-actinina, tropomiosina, troponina T, titina,

nebulina, miosina do tipo II e miosina-rápida, tiveram as periodicidades das suas estriações quantificadas através do programa Image J. A região de marcação fluorescente era delimitada por uma reta perpendicular ao comprimento dos sarcômeros e os dados de intensidade de marcação fluorescente eram exportados para o programa Excel (Microsoft) e gráficos eram feitos.

## IV - RESULTADOS

Este trabalho de dissertação teve como principal objetivo a caracterização das estruturas miofibrilares e mitocondriais presentes no tecido muscular esquelético do peixe-zebra adulto (*Danio rerio*). Através de microscopia óptica e eletrônica foi possível estudar a morfologia do músculo do peixe-zebra.

Mitocôndrias são organelas imprescindíveis para o funcionamento do aparato contrátil da fibra muscular esquelética. No peixe-zebra foram localizadas e distribuídas abundantemente não somente na região periférica, como também disseminadas em regiões mais centrais conforme demonstrado por meio de asteriscos nas **Figuras 7 (A-D)**. Em cortes ultrafinos de tecidos musculares do peixe-zebra adulto foram identificadas várias mitocôndrias na região periférica, algumas mais arredondadas e outras mais alongadas (**Figura 7A**). Outros detalhes foram preservados por meio de processamento do espécimen para microscopia eletrônica de transmissão, como parte do retículo sarcoplásmico e túbulos T, associados – formando as tríades musculares, indicadas pela ponta da seta na cor preta (**Figura 7B**). Na mesma figura (**Figura 7B**), áreas eletrondensas representam as cisternas terminais granulares do retículo sarcoplasmático localizadas próximas aos túbulos transversos, sendo estas estruturas identificadas pelas pontas das setas brancas.

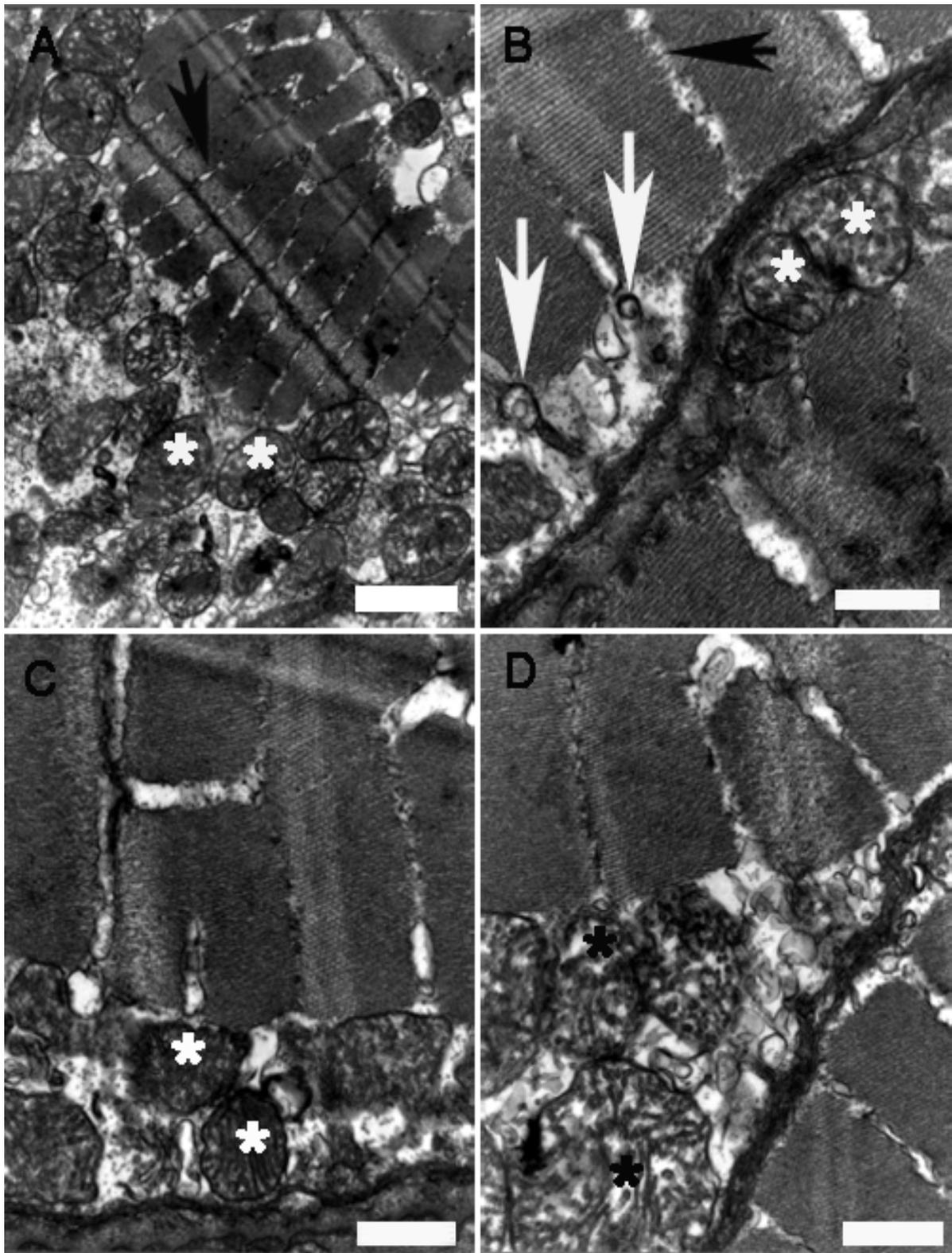


Figura 7:

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão. (A, B, C, D) Mitocôndrias, abundantes, em tamanhos e formas diferentes, na região periférica do tecido muscular do peixe-zebra (indicadas por asteriscos). (A e B) Detalhes do retículo sarcoplásmico e túbulos T associados (formando a tríade muscular) estão indicados por setas na cor preta. (B) Áreas eletrondensas representam as cisternas terminais granulares do retículo sarcoplásmático se localizando adjacente aos túbulos transversos (setas brancas). Barras = 2  $\mu\text{m}$  (A); 500 nm (B e C); 200 nm (D).

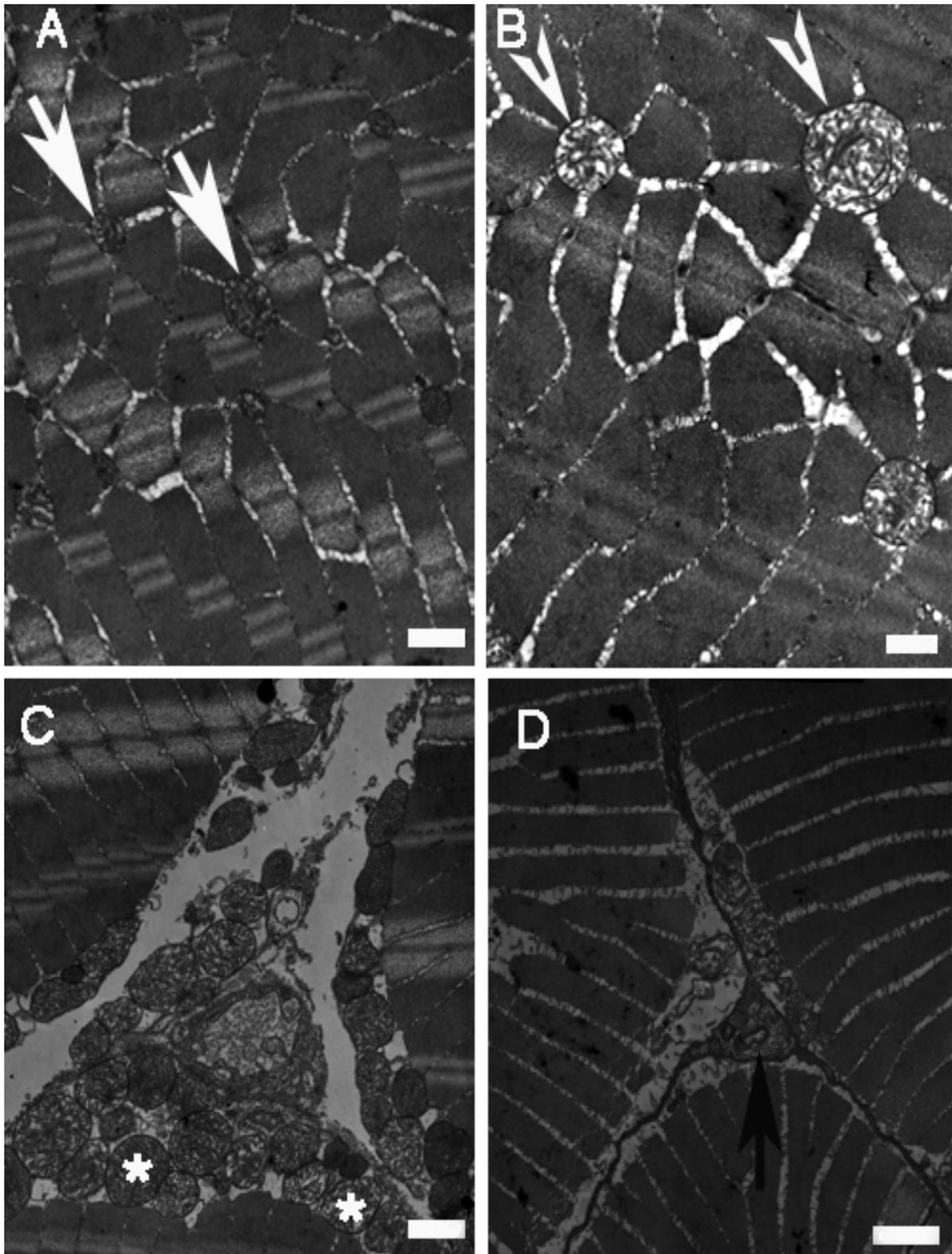


Figura 8:

Figura 8: (A-B) Eletronmicrografia mostrando mitocôndrias arredondadas entre miofibrilas (setas e cabeças de setas brancas, respectivamente em A e B). (C) Mitocôndrias próximas às miofibrilas são indicadas por asteriscos. (D) Núcleo de uma das fibras musculares intercalado por miofibrilas. Barras = 500 nm (A); 1 $\mu$ m (B, C e D).

As **Figuras 8 (A-B-C)** mostram imagens de microscopia eletrônica do músculo esquelético com corte transversal com numerosas mitocôndrias observadas associadas às miofibrilas, sendo as mitocôndrias destacadas por meio de setas, cabeças de setas e asteriscos (todos na cor branco). Núcleo das fibras musculares intercalado por outras miofibrilas adjacentes foi observado (**Figura 8 D**) e é indicado pela seta preta.

Na **Figura 9** mitocôndrias arredondadas são muito bem identificadas próximas às miofibrilas e estão indicadas por setas brancas. Outros detalhes da ultra-estrutura tais como a membrana externa (indicada por cabeça de seta na cor preta), além da membrana interna (cabeça de seta branca), bem como a crista e a matriz mitocôndriais (indicadas por asterisco). Todas estas particularidades são observadas no tecido muscular do peixe-zebra adulto, através de microscopia eletrônica de transmissão.

As células musculares esqueléticas diferenciadas do peixe-zebra possuem poucos núcleos, os quais podem ser bem visualizados por meio de microscopia eletrônica de transmissão em secção transversal do tecido muscular esquelético (**Figura 10**). Na **Figura 10A**, pode-se notar a presença de um núcleo próximo às miofibrilas periféricas e uma pequena mitocôndria arredondada. O mesmo núcleo da célula muscular em maior aumento, mostrando ligação com as miofibrilas (apontado por asterisco na **Figura 10B** .

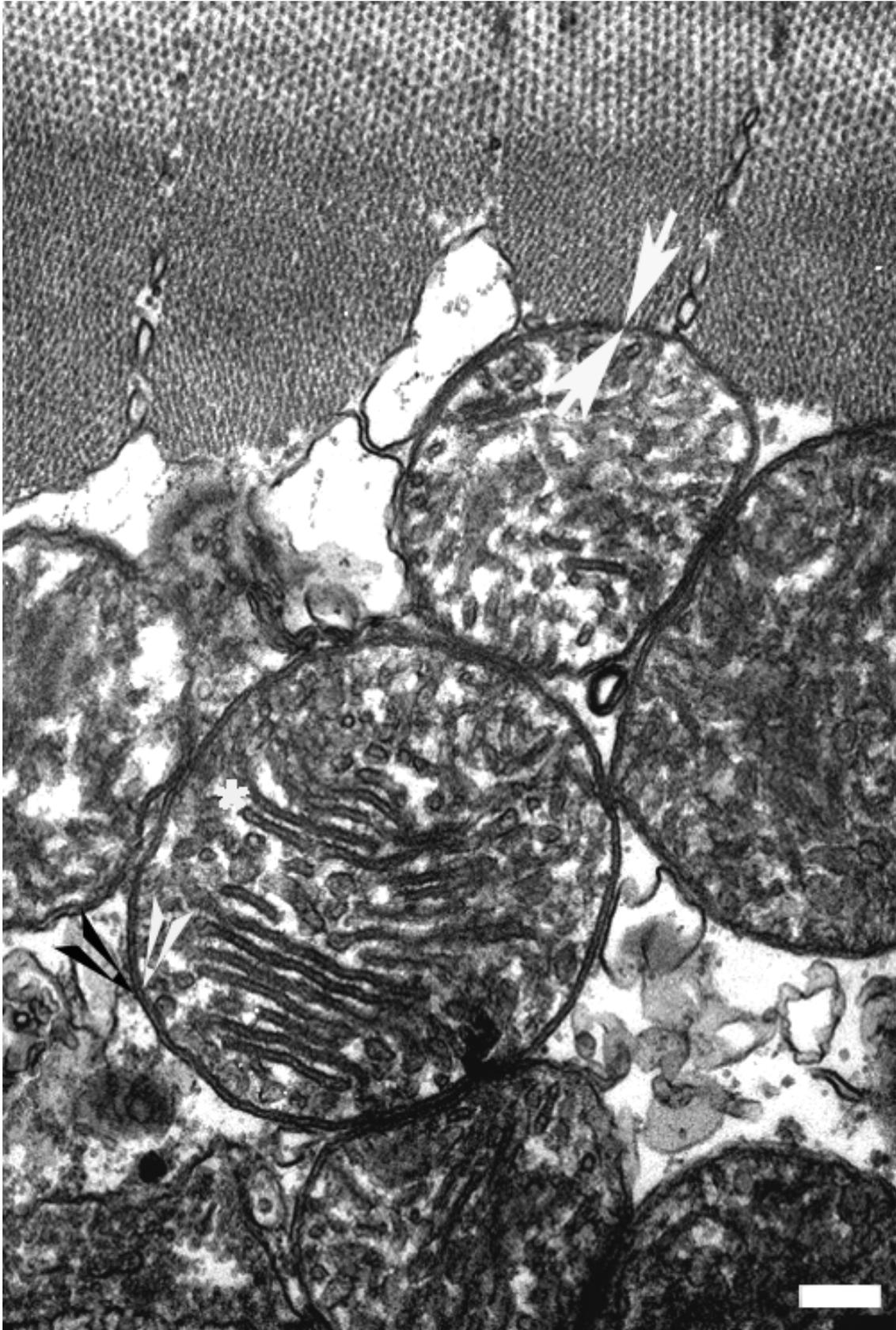


Figura 9: Eletronmicrografia mostrando detalhes de mitocôndrias arredondadas: Mitocôndrias próximas às miofibrilas são indicadas por setas brancas. Outros detalhes como a membrana externa é indicada por cabeça de seta na cor preta. Membrana interna (cabeça de seta branca). Crista e matriz mitocondriais são indicadas por asterisco. Barras = 200 nm.

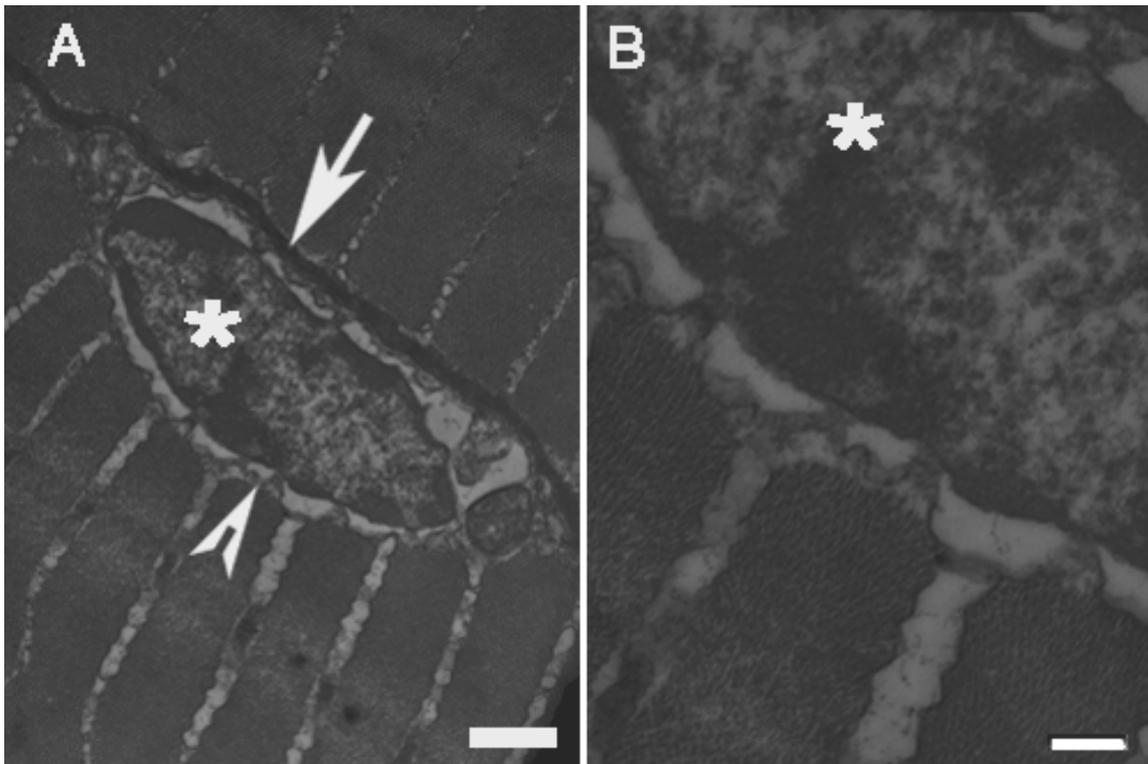


Figura 10: (A) Eletronmicrografia mostrando núcleo (indicado por asterisco), próximo às miofibrilas periféricas (cabeça de seta branca) e pequena mitocôndria arredondada. A seta branca destaca a relação proximal entre o núcleo e as miofibrilas. (B) Núcleo da célula muscular em maior aumento, mostrando ligação com as miofibrilas (apontado por asterisco). Barras = 500 nm (A); 200 nm (B).

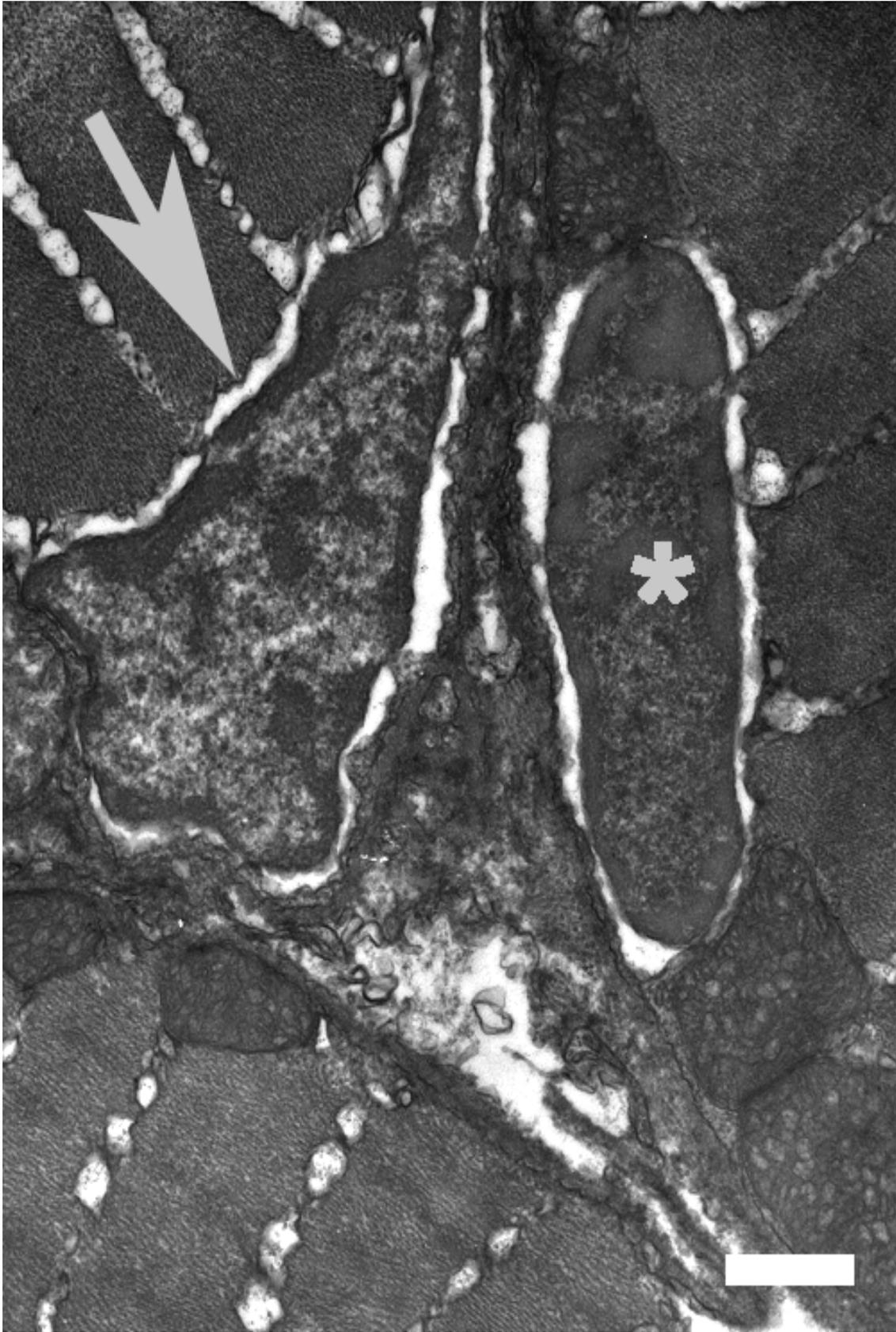


Figura 11: Eletronmicrografia de provável célula satélite proximal ao núcleo e algumas mitocôndrias, intercaladas por miofibrilas. O asterisco indica a célula satélite e a seta destaca o sarcolema. Barra = 500nm.

Além disso, é possível se ver uma célula que possui morfologia compatível com a de uma célula satélite (**Figura 11**). Células satélites são células quiescentes capazes de, quando ativadas, participarem da regeneração muscular. Os núcleos destas células são grandes em relação ao sarcoplasma. Estes núcleos têm, em geral, áreas de heterocromatina bastantes condensadas e caracterizam-se pela ausência de organelas no citoplasma. São encontradas entre a lâmina basal e a membrana sarcoplasmática.

Além do que se acredita ser uma célula satélite, outros elementos, só que desta, componentes miofibrilares do tecido muscular do peixe-zebra podem ser também visualizados na **Figura 12**. Secções transversais da fibra muscular em mostram detalhes da conformação dos filamentos de actina localizados nas bandas I dos sarcômeros (bandas claras) e dos filamentos espessos de miosina nas bandas A dos sarcômeros (bandas escuras). A clássica descrição da superposição de filamentos finos de actina e filamentos espessos de miosina encontram-se aqui bem caracterizada. Diferenças de densidades e eletrondensidades caracterizam bem as bandas claras e as bandas escuras, como pode ser visto na **Figura 12A**. Detalhes da distribuição do complexo protéico actina-miosina podem ser analisados nas **Figuras 12B e 12C**. Pôde-se notar como os filamentos de actina estão arranjados ao redor de filamentos de miosina, com pontes cruzadas estendendo-se entre eles (**Figura 12D**). O esquema (**Figura 13**) demonstra esta clássica distribuição do complexo actina-miosina.

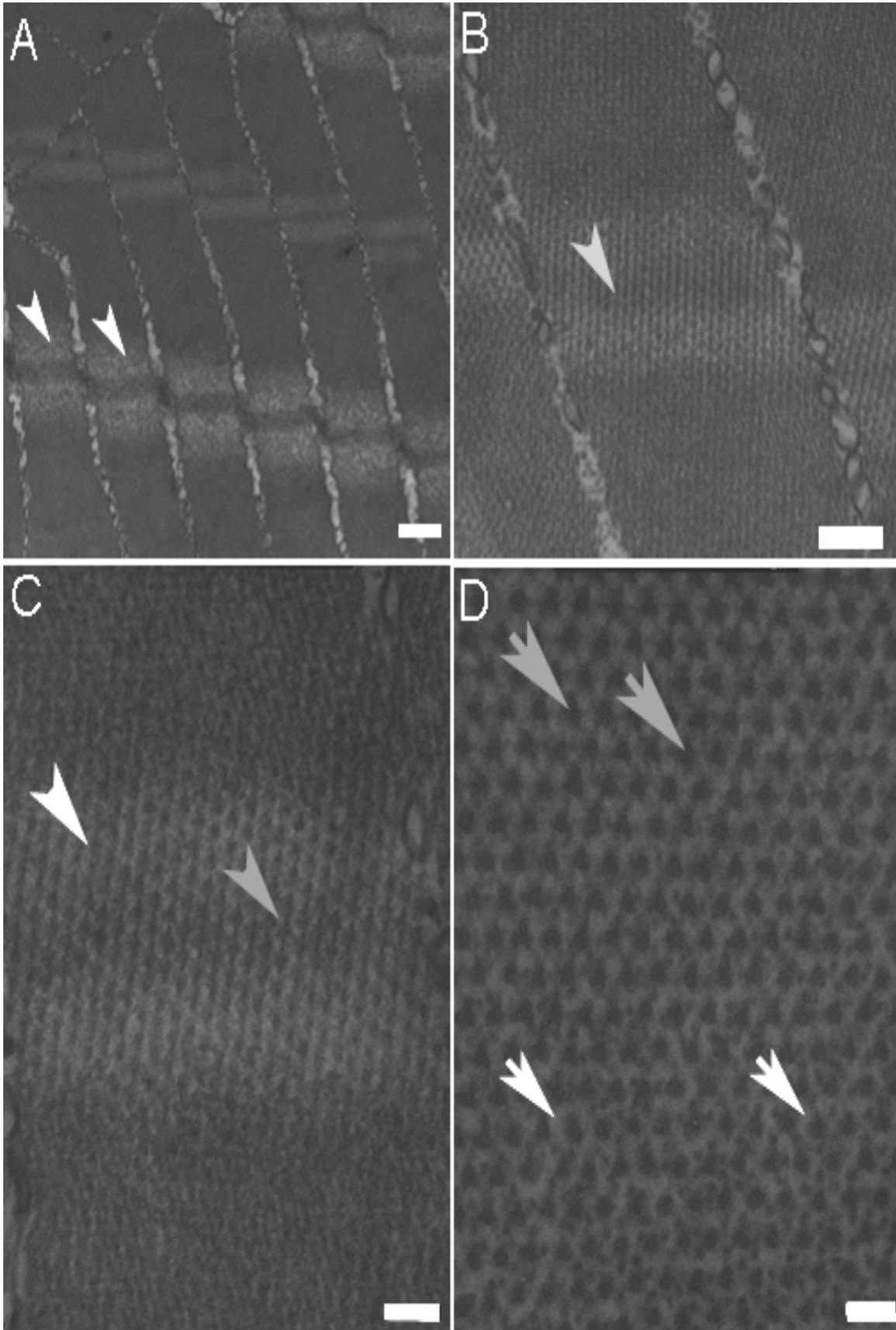


Figura 12: (A-B-C) Cortes transversais de tecido muscular mostrando um padrão de periodicidade na região das miofibrilas: Banda I – onde ocorre a distribuição de actina (cabeças de setas brancas). Banda A – onde ocorre a distribuição de miosina (cabeças de setas cinzas). (D) Detalhes da distribuição do complexo protéico actina-miosina, onde se pode visualizar o arranjo de filamentos finos de actina ao redor de filamentos espessos de miosina. Barras = 500 nm (A); 200 nm (B); (C); 100 nm e 50 nm (D).

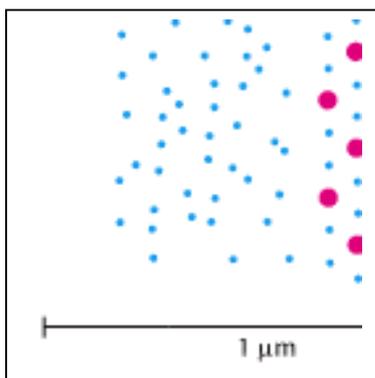


Figura 13: Esquema da distribuição do complexo protéico actina-miosina: pontos na cor rosa indicam a presença de miosina. Pontos na cor azul representam as moléculas de actina. Note na região central que para cada molécula de miosina há seis de actina (adaptado de Lodish, 2000).

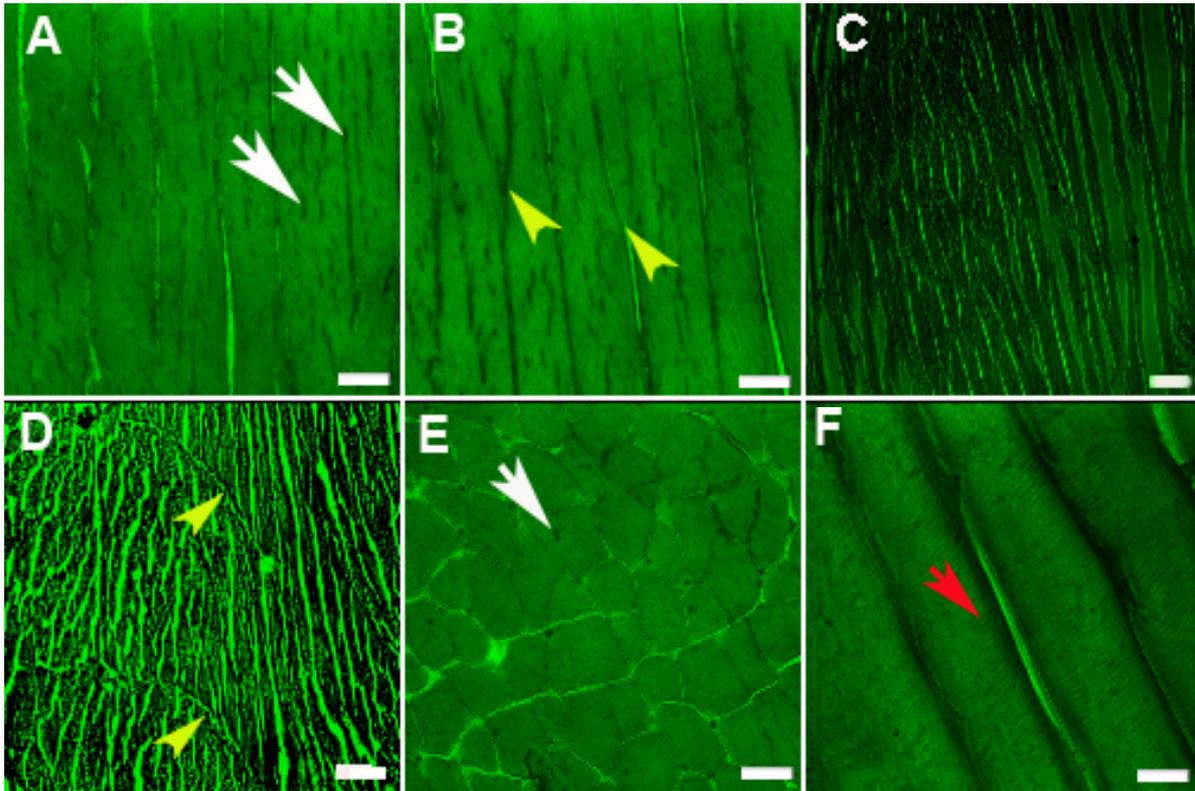


Figura 14: Microscopia óptica de campo claro - Coloração do tecido muscular do peixe-zebra com verde de Janus: (A) Várias mitocôndrias alongadas e circulares podem ser visualizadas não somente na região periférica, bem como amplamente distribuídas pelas fibras musculares (setas brancas) em corte longitudinal. (B-D) Septos em chevrom (indicados com cabeças de setas amarelas). (C) Corte longitudinal da fibra muscular. (C-D) Septos musculares. Secções transversal (E) e longitudinal (F) do músculo esquelético do peixe-zebra. Setas branca e vermelha indicam mitocôndrias e a periodicidade de estriações, respectivamente.

Barra = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes em A-B-D; 5  $\mu\text{m}$  (C); 20  $\mu\text{m}$  (E-F).

As imagens da **Figura 14** foram obtidas por meio de microscopia de campo claro. A visualização de cortes longitudinais de tecidos musculares congelados submetidos à coloração com verde de Janus permitiram a observação de mitocôndrias, as quais foram observadas intercaladas entre as aglomerações dos miofilamentos do peixe-zebra em cortes transversais e longitudinais de tecido muscular (**Figuras 14A-14E**). Septos em forma de chevron (áreas de tecido conjuntivo existentes entre as miofibrilas e em forma de “V”) são identificados pelas cabeças de setas na cor amarelo (**14B-14D**). A organização geral das miofibrilas (**14C**), bem como a preservação do tecido e a preservação de estriações transversais (**14F**) estão demonstradas.

Já na **Figura 15A**, em um corte longitudinal do tecido muscular submetido à coloração com hematoxilina-eosina, as bainhas e endomísio estão densamente coradas e intercalando cada fibra muscular. Os núcleos (mais densamente corados) estão distribuídos próximos à membrana. Estriações transversais podem ser, nitidamente, observadas e demonstradas (**Figura 15A**). Em secção transversal do músculo, fibras musculares contendo miofibrilas e núcleos de células musculares podem ser observados circundados por bainhas endomisiais localizadas entre as fibras musculares (**Figura 15B**).

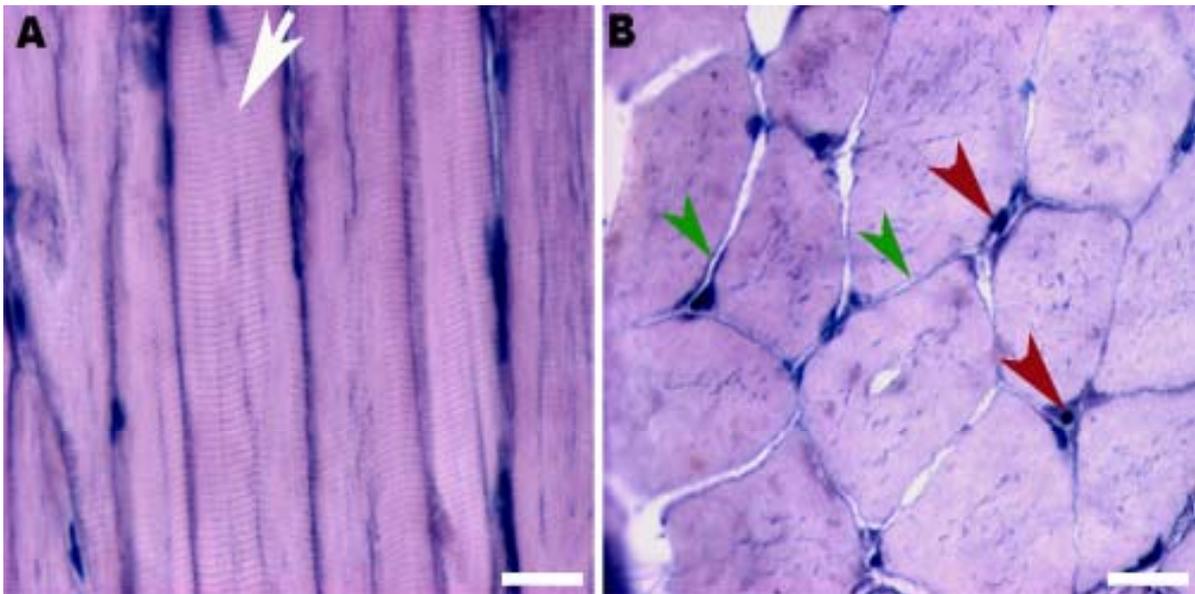


Figura 15: Tecido muscular do peixe zebra com coloração com Hematoxilina-Eosina: (A) As periodicidades das estriações transversais são indicadas pela seta branca. (B) Secção longitudinal. Núcleos periféricos densamente corados (cabeças de setas vermelhas), e bainhas endomisiais circundando as fibras musculares (cabeças de setas em verde). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

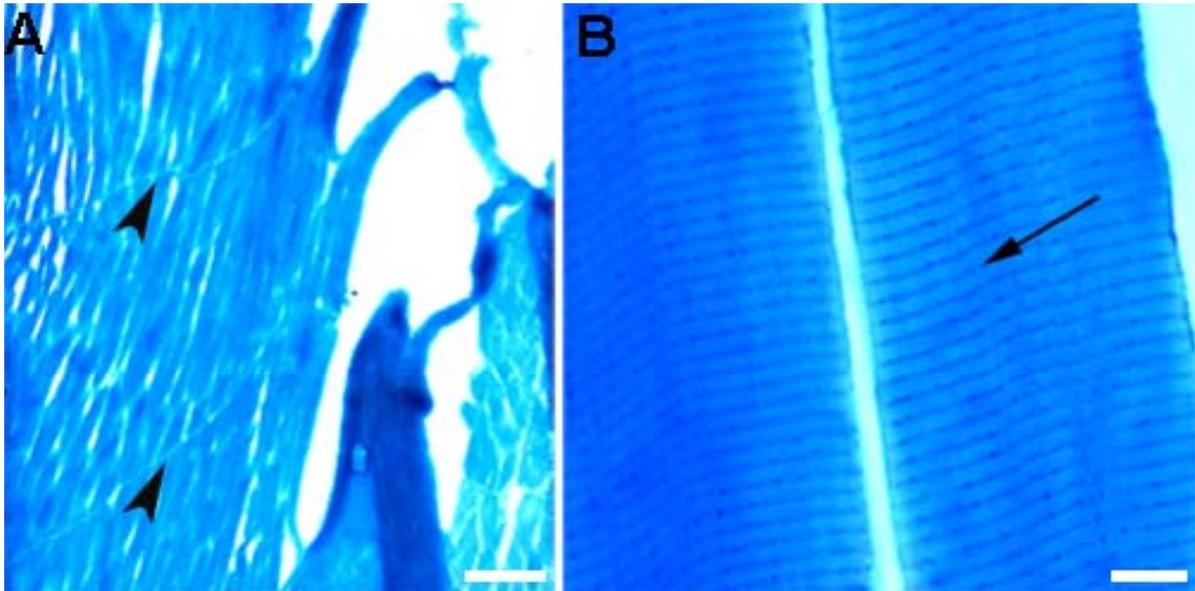


Figura 16: Periodicidade das estriações transversais na fibra muscular do peixe-zebra vista através de coloração com azul de toluidina. (A) Fibras e septos musculares. As cabeças de setas pretas indicam os septos. (B) A periodicidade das estriações transversais encontra-se destacada pela seta. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Inicialmente, analisamos a preservação da estrutura do tecido muscular obtido a partir de espécimens adultos do peixe-zebra congelados com isopentano (para detalhes, ver Materiais e Métodos). A periodicidade das estriações transversais, típica de fibras musculares esqueléticas, foi também encontrada com ordenação preservada na fibra muscular do peixe-zebra (**Figura 16**). Esta periodicidade pode ser visualizada através de cortes congelados com 10  $\mu\text{m}$  de espessura e corados com azul de toluidina (**Figura 16B**). Na **Figura 16A** podemos observar a presença de septos em forma de “V” entre as células musculares. Estes septos são descritos como sendo regiões constituídas por tecido conjuntivo e que se intercalam entre as regiões de tecido muscular estriado esquelético (Costa *et al.*, 2002).

Desta forma, os resultados obtidos por meio de microscopia óptica de campo claro e por meio de microscopia eletrônica de transmissão demonstram que o material biológico em estudo foi submetido a protocolos adequados à preservação do tecido muscular esquelético do peixe-zebra.

Após o estabelecimento do protocolo de congelamento e criomicrotomia, partimos para uma avaliação mais detalhada da expressão e distribuição de proteínas sarcoméricas. Esta etapa realizou-se por meio de imunohistoquímica e microscopia óptica, sendo iniciada pela avaliação de controles negativos (só com a presença de anticorpos secundários) e autofluorescência.

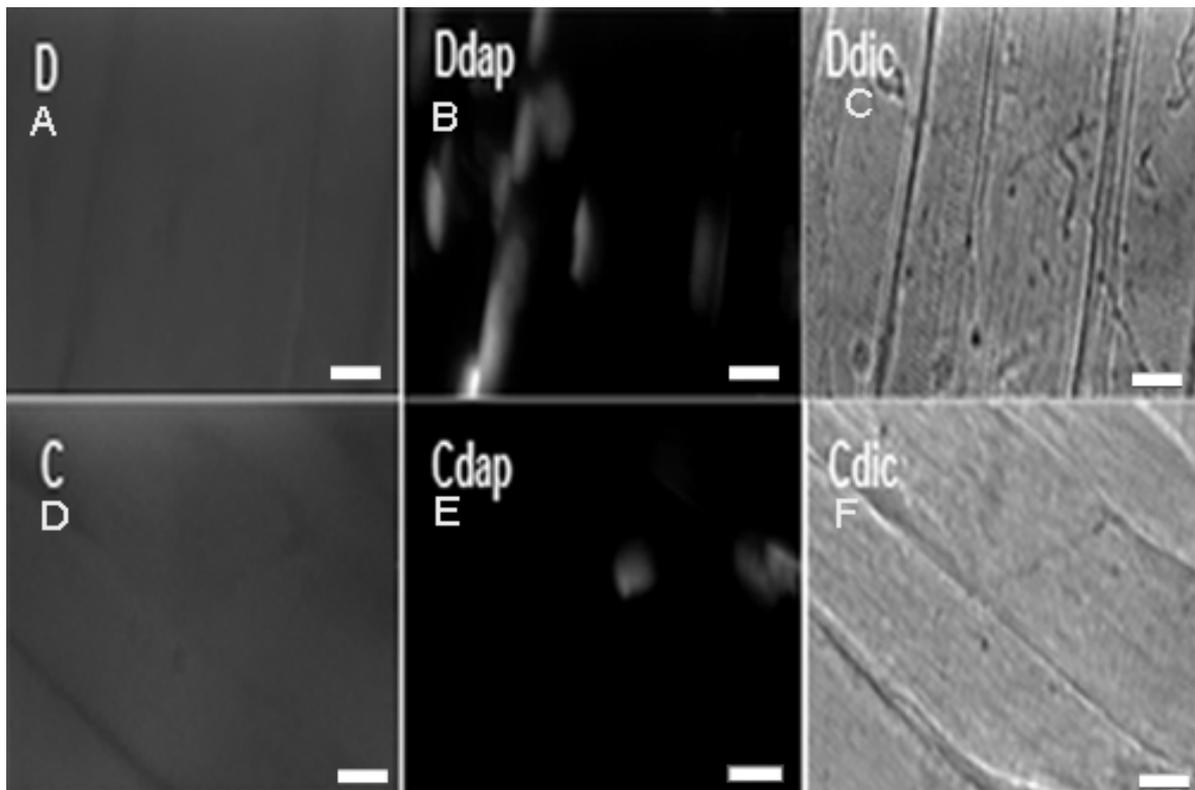


Figura 17: Imunofluorescências de tecido muscular com marcações de anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (D) e anti-IgG de coelho (C) ambos conjugados à rodamina. (A-B-C) marcações de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo - (A) marcações com a sonda DAPI foram feitas para visualização de núcleos. (C) O tecido é observado por DIC nas extremidades distais. (D-E-F) Marcações de anticorpo secundário anti-IgG de coelho – visualizadas nas mesmas condições do anterior. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes em todas as imagens.

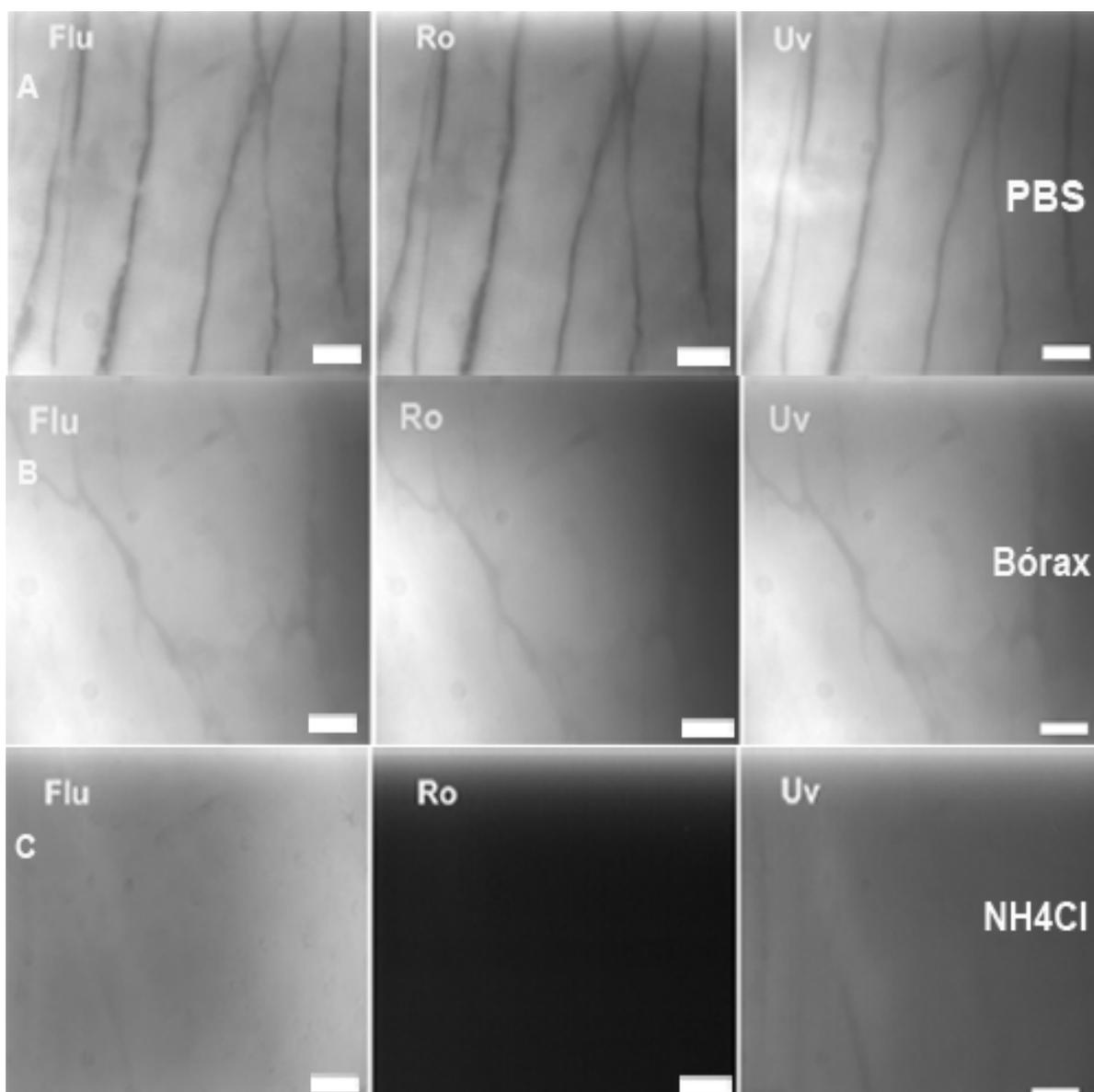


Figura 18: Controles: (A-B) marcações inespecíficas e autofluorescências foram identificadas através de visualização de fluoresceína (Flu), rodamina (Ro) e ultravioleta (Uv) em cortes de tecidos lavados com PBS e incubados com Bórax, respectivamente. (C) Cortes de tecidos musculares bloqueados com cloreto de amônio (50 mM) foram observados em microscopia de fluorescência nos três filtros: marcações inespecíficas e autofluorescências foram observadas apenas através de visualização de fluoresceína (Flu) e fraca na luz ultravioleta (Uv). Barra = 10  $\mu$ m para todas as imagens.

Iniciamos nova etapa e partimos então para os experimentos de controles de possíveis marcações fluorescentes inespecíficas (oriundas dos anticorpos secundários utilizados). Cortes congelados do tecido muscular do peixe foram obtidos e submetidos às incubações onde somente os anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos foram incubados (com omissão de anticorpos primários). Na **Figura 17** é possível observar dois cortes de músculo, sendo um dos cortes (o primeiro) incubado com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à rodamina (TRITC), com a sonda fluorescente DAPI (que marca núcleos), e ainda observado por meio de contraste interferencial diferencial (DIC). (**Figuras 17A-17-B-17C**). Já o outro corte do tecido muscular do peixe (o segundo) foi incubado com o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à rodamina (TRITC), o qual também foi visualizado nas mesmas condições do primeiro. (**Figuras 17D-17E-17F**). Pode-se notar que o anticorpo secundário incubado sem a presença de anticorpo primário, mostra marcação fluorescente inespecífica, mas mantém a autofluorescência (**Figura 17**). Desta forma, procedemos a testes com incubações com um coquetel de leite em pó, albumina bovina e soro fetal bovino, com a finalidade de eliminar marcações fluorescentes inespecíficas dos anticorpos secundários. Os resultados mostram que este coquetel praticamente eliminou este tipo de marcação indesejada. Este coquetel de bloqueadores foi então incorporado ao protocolo de marcações imunofluorescentes de cortes de tecido muscular do peixe-zebra.

Para a obtenção de resultados confiáveis, iniciamos a segunda etapa com nossos controles dos experimentos de imunofluorescência com a análise

de autofluorescência, bastante comum em tecidos musculares. Observamos que o tecido muscular do peixe-zebra apresentava forte autofluorescência com os filtros dicróicos utilizados: verde, vermelho e ultra-violeta. Decidimos então testar alguns reagentes já descritos na literatura como sendo eficientes na eliminação desta autofluorescência: o bórax e o cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Estes reagentes são descritos como capazes de bloquear sítios aldeídicos livres, diminuindo-se não somente as marcações inespecíficas, bem como controlando a autofluorescência. Cortes congelados foram submetidos aos seguintes testes: lavagem apenas com PBS (**Figura 18A**), ou apenas com o bórax (**Figura 18B**), ou apenas com cloreto de amônio (**Figura 18C**). A análise destes resultados nos mostrou que o cloreto de amônio foi satisfatório para o controle da autofluorescência (**Figura 18C**). Já o bórax não mostrou efeito quanto à eliminação da autofluorescência. Apesar de satisfatório, salienta-se que o cloreto de amônio bloqueou a autofluorescência somente no filtro verde equivalente à excitação de rodamina (TRITC), não sendo eficaz para o filtro azul equivalente à excitação da fluoresceína (FITC). Assim sendo, em conseqüências desses resultados estabeleceu-se o uso do cloreto de amônia como bloqueador de autofluorescência no filtro verde.

Iniciamos a terceira etapa com as marcações com anticorpos primários contra proteínas sarcoméricas para análise em microscopia de imunofluorescência. A primeira proteína a ser estudada foi a desmina, que é um marcador específico de células musculares e faz parte dos filamentos intermediários do citoesqueleto.

Já foi descrito por nosso laboratório que a desmina aparece como pequenos aglomerados em células jovens do músculo esquelético do peixe-zebra (Costa et al., 2002). Confirmamos neste trabalho de dissertação que a desmina também pode ser observada em miofibrilas de fibras musculares do peixe-zebra adulto, delimitando cada unidade sarcomérica de uma linha Z a outra (**Figura 19**). Nas **Figuras 19A-19D**, podemos ver uma imunofluorescência onde o anticorpo anti-desmina foi utilizado e esta proteína foi localizada em estriações transversais na região de linhas Z (indicadas por setas brancas); enquanto vemos os núcleos através da sonda fluorescente DAPI em azul (**Figuras 19B-19E**). A sobreposição das imagens anteriores permite a observação de áreas de co-localização entre núcleos e as miofibrilas, as quais são representadas pelas cabeças de setas na cor verde (**Figuras 19C-19F**). A avaliação morfométrica foi realizada para cada proteína estudada e o gráfico (**Figura 20**) representa a preservação de periodicidade das estriações transversais da proteína desmina, bem como quantifica a distância média (2,3mm) entre cada unidade sarcomérica.

Outras proteínas do citoesqueleto foram então estudadas: a tropomiosina (**Figura 21**), a troponina T (**Figura 23**), e a titina (**Figura 25**). Estas três proteínas foram observadas em estriações transversais no tecido muscular do peixe-zebra adulto, integrando áreas de bandas I de actina (setas brancas das respectivas figuras citadas, anteriormente).

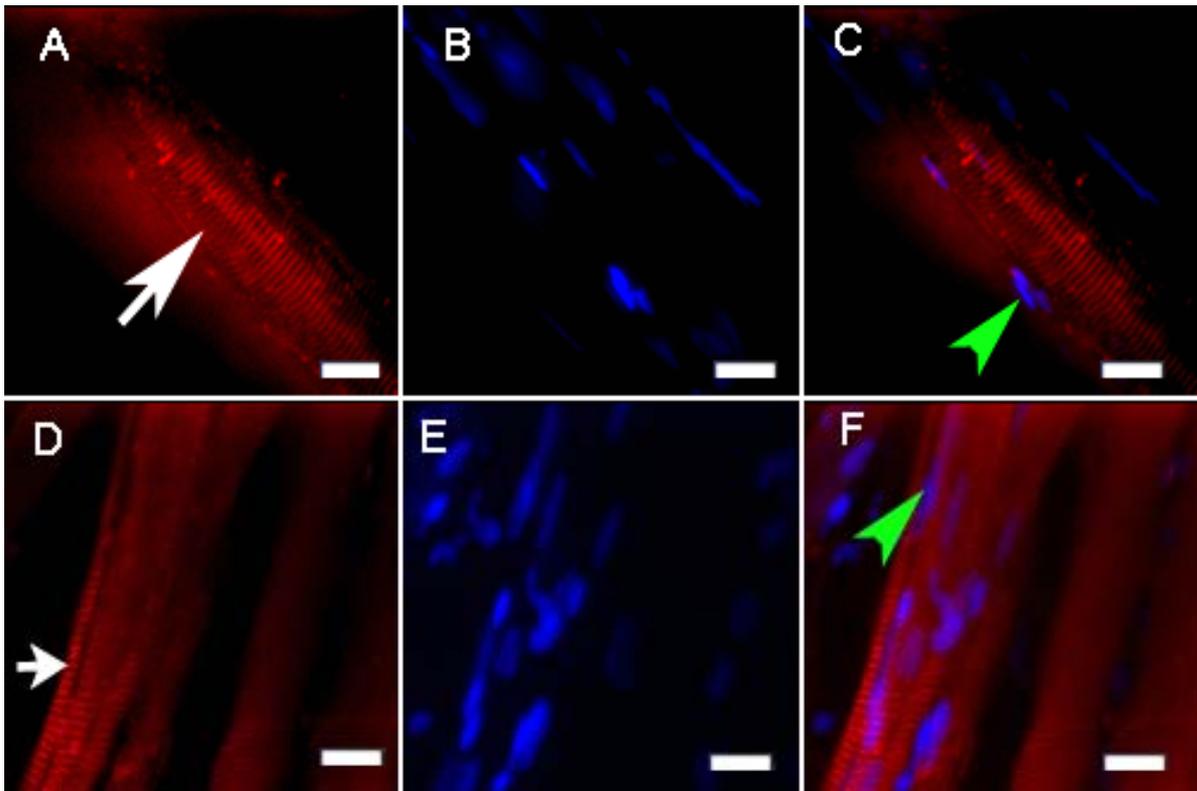


Figura 19:

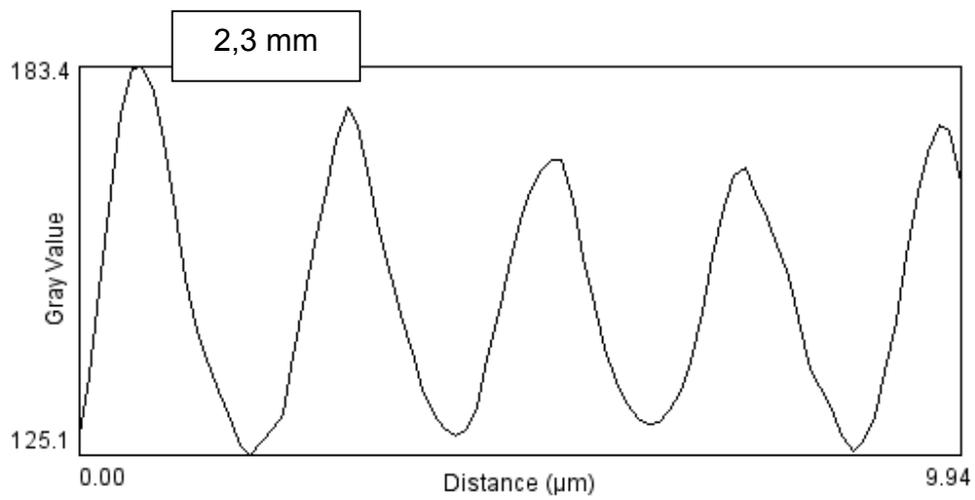


Figura 20:

Figura 19: (A-D) Imunofluorescências com anticorpo anti-desmina em estriações transversais: as setas brancas indicam a presença de desmina, intensamente marcada, na Linha Z. (B-E) DAPI em azul denota a presença de núcleos. (C-F) Superposição das imagens anteriores, onde as cabeças de setas verdes indicam as co-localizações. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 20: Gráfico da periodicidade da marcação de desmina em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância de um pico ao outro de cada sarcômero = 2,3  $\mu\text{m}$ .

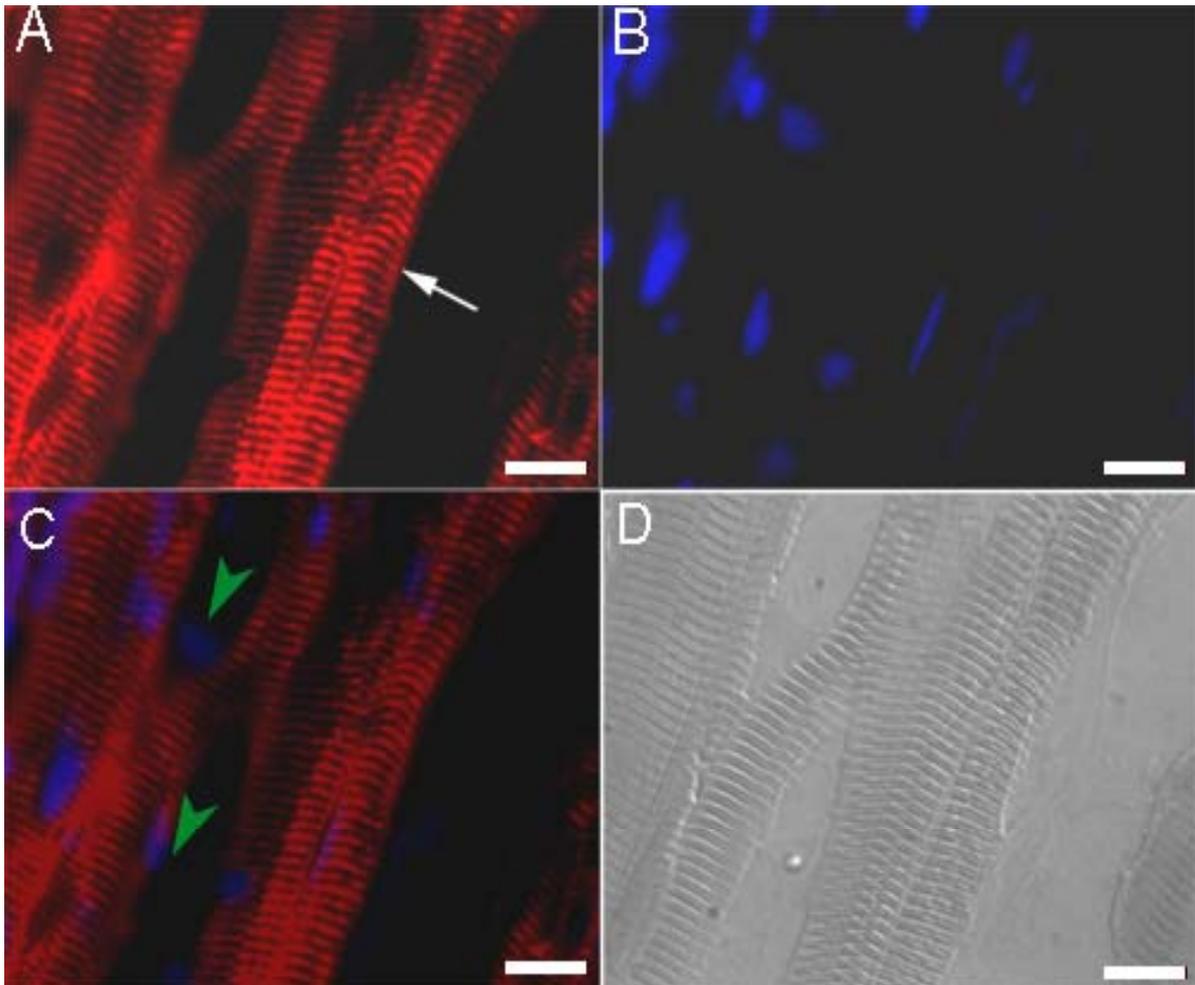


Figura 21:

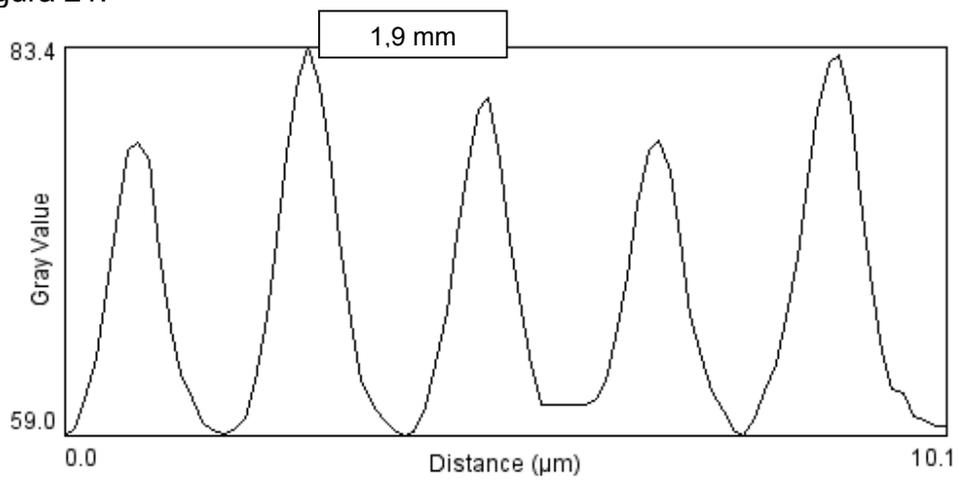


Figura 22:

Figura 21: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-tropomiosina: Estriações densamente marcadas na banda I são indicadas pela seta branca. (B) DAPI em azul revela núcleos. (C) Superposição das duas imagens anteriores – as cabeças de setas verdes indicam co-localizações. (D) DIC (cinza) em corte longitudinal do tecido muscular do peixe. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 22: Gráfico da periodicidade da marcação de tropomiosina em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância entre um pico ao outro de cada sarcômero = 1,9  $\mu\text{m}$ .

Tanto a tropomiosina como a troponina são proteínas que se associam à filamentos de actina (bandas I) nos sarcômeros. Titina, entretanto, é uma proteína multifuncional que se estende da linha M até a linha Z (conservando os filamentos espessos de miosina. Nestas **Figuras (21 e 23)** podemos ver a marcação de núcleos com a sonda DAPI em azul, DIC em cinza e a superposição dos campos co-localizando os núcleos (cabeças de seta na cor verde).

Na **Figura 25**, a proteína titina é identificada em áreas das junções das bandas A e I (seta branca). Os núcleos são revelados por DAPI em azul. A avaliação morfométrica foi realizada para cada uma destas proteínas estudadas e os gráficos (**Figuras 22-24-26**) representam a preservação de periodicidade das estriações transversais pela distribuição das proteínas tropomiosina, troponina T e titina, bem como quantificam a distância média (1,9; 2,2; 1,6mm, respectivamente) entre cada unidade sarcomérica.

A proteína nebulina foi expressa também em áreas de estriações próximas ao sarcolema, indicada pela seta branca (**Figura 27A**), em estriações próximas aos septos musculares, identificada pela seta verde (**Figura 27D**), e marcada com bastante evidência (seta azul) no meio da fibra muscular (**Figura 27G**).

Alfa-actinina, um dos principais componentes da linha Z de miofibrilas, tem a capacidade de interagir com várias proteínas, como a actina e a desmina foi também estudada como descrito a seguir.

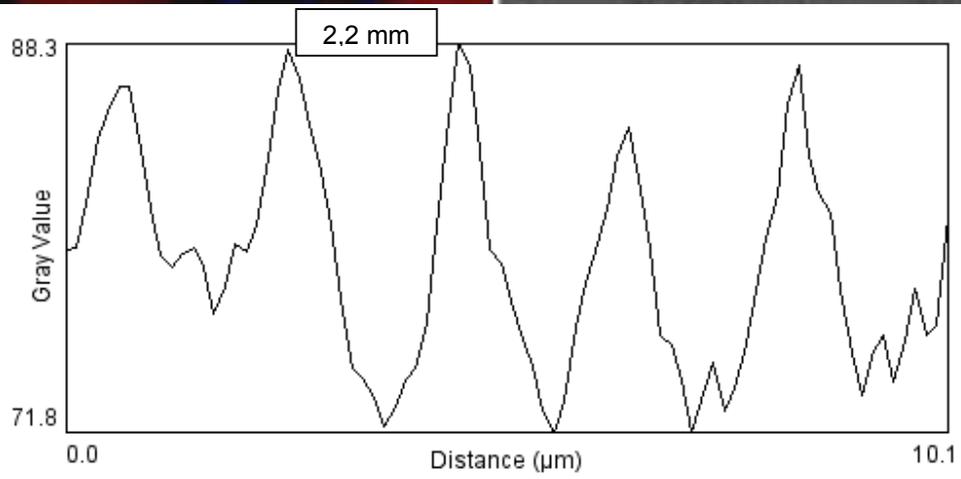
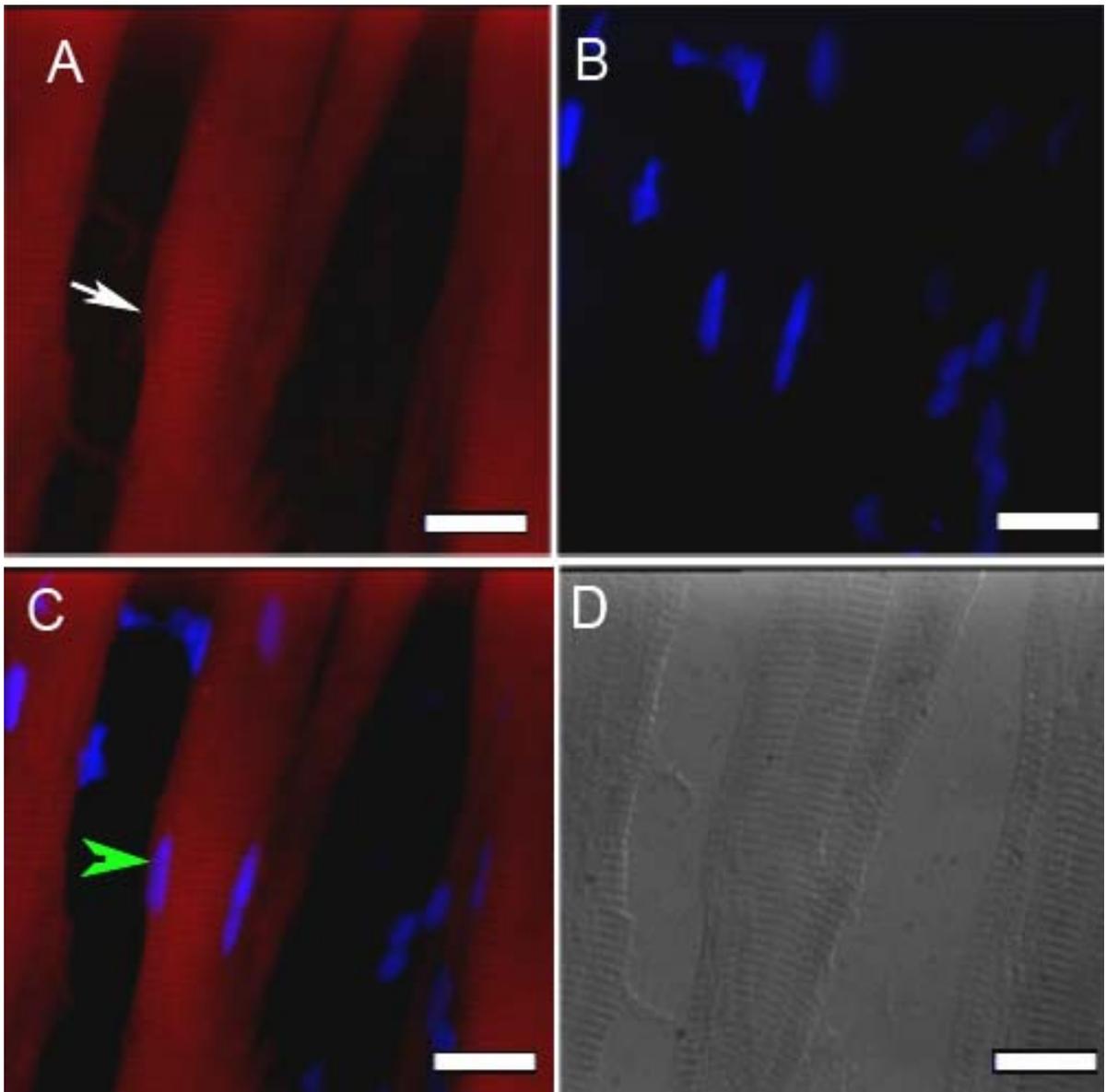


Figura 23: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-troponina T. Estriações (seta branca) marcadas na banda I. (B) DAPI em Azul e (C) DIC em cinza da mesma região da figura anterior. (D) Superposição das imagens anteriores, onde a cabeça de seta verde indica a co-localização. Barra = 10  $\mu\text{m}$  para todas as imagens. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 24: Gráfico da periodicidade da marcação de troponina T em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância entre um pico ao outro de cada sarcômero = 2,2  $\mu\text{m}$ .

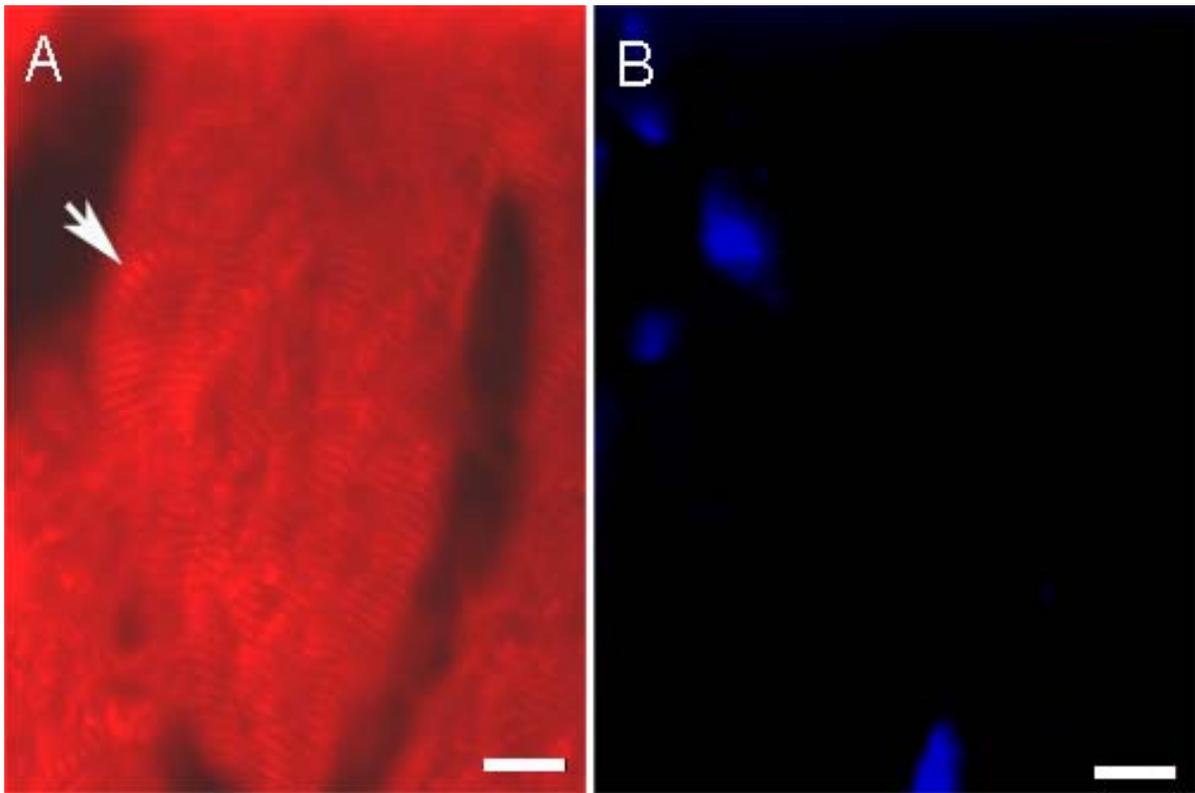


Figura 25:

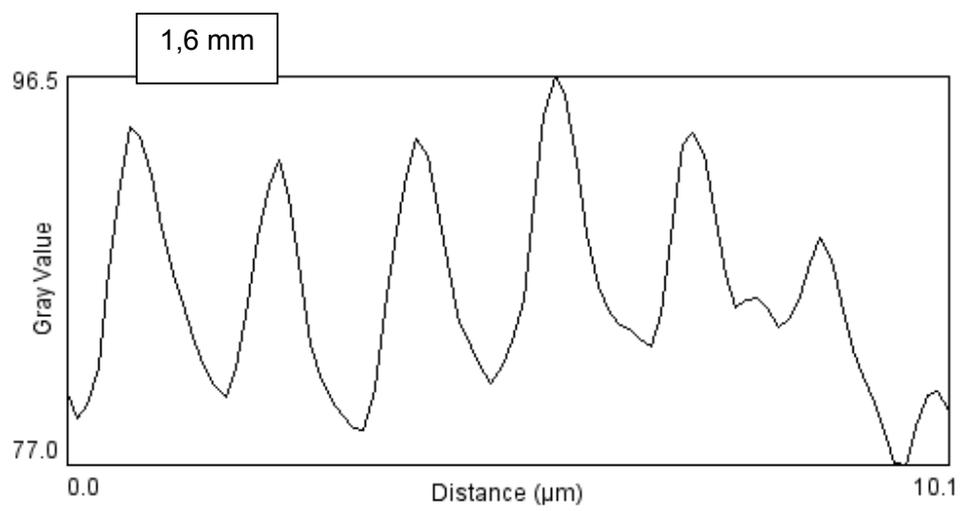


Figura 26:

Figura 25: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-titina em tecido muscular do peixe-zebra adulto: As junções das bandas A e I marcam para titina (seta). (B) DAPI em azul demonstra núcleos. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 26: Gráfico da periodicidade da marcação de titina em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância entre um pico ao outro de cada sarcômero = 1,6  $\mu\text{m}$ .

Na **Figura 29A**, encontramos a alfa-actinina marcando estriações na região de linhas Z em corte longitudinal do músculo de peixe-zebra adulto (seta branca), possivelmente se ligando a filamentos de actina e de desmina. DAPI em azul revela núcleos, a co-localização deste pela superposição de imagens (cabeças de setas branca) e DIC em cinza mostra a estrutura geral do tecido (**Figuras 29B-C-D, respectivamente**). Os gráficos (**Figuras 28-30**) representam as periodicidades das proteínas nebulina e alfa-actinina com medidas para cada uma destas iguais a 2,1 e 1,7  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

A próxima proteína analisada no músculo do peixe-zebra foi a miosina. A **Figura 31A** mostra a presença da proteína miosina do tipo II em estriações sarcoméricas localizadas nas bandas A (local onde são encontrados os filamentos grossos de miosina – ver seta branca). Os núcleos são visualizados pela sonda DAPI em azul (**Figura 31B**).

Depois de localizarmos a miosina no músculo do peixe, decidimos estudar a possível presença de isoformas de miosina rápida e lenta neste tecido para entender mais de sua fisiologia contrátil. A **Figura 33A** corresponde à imunofluorescência com anticorpo anti-miosina rápida e mostra esta isoforma protéica da miosina do tipo II também presente em bandas A de estriações transversais sarcoméricas (seta branca). O DAPI em azul revela os núcleos (**Figura 33B**). Sobreposição das imagens anteriores co-localizam os núcleos (cabeça de seta amarela na **Figura 33 C**) e em cinza observamos o DIC (**Figura 33D**) em cortes longitudinais do músculo de peixe-zebra adulto.

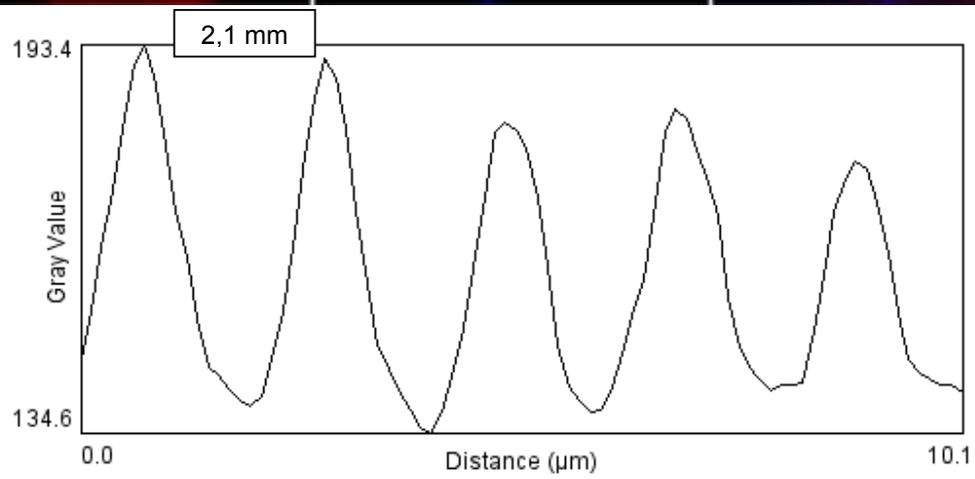
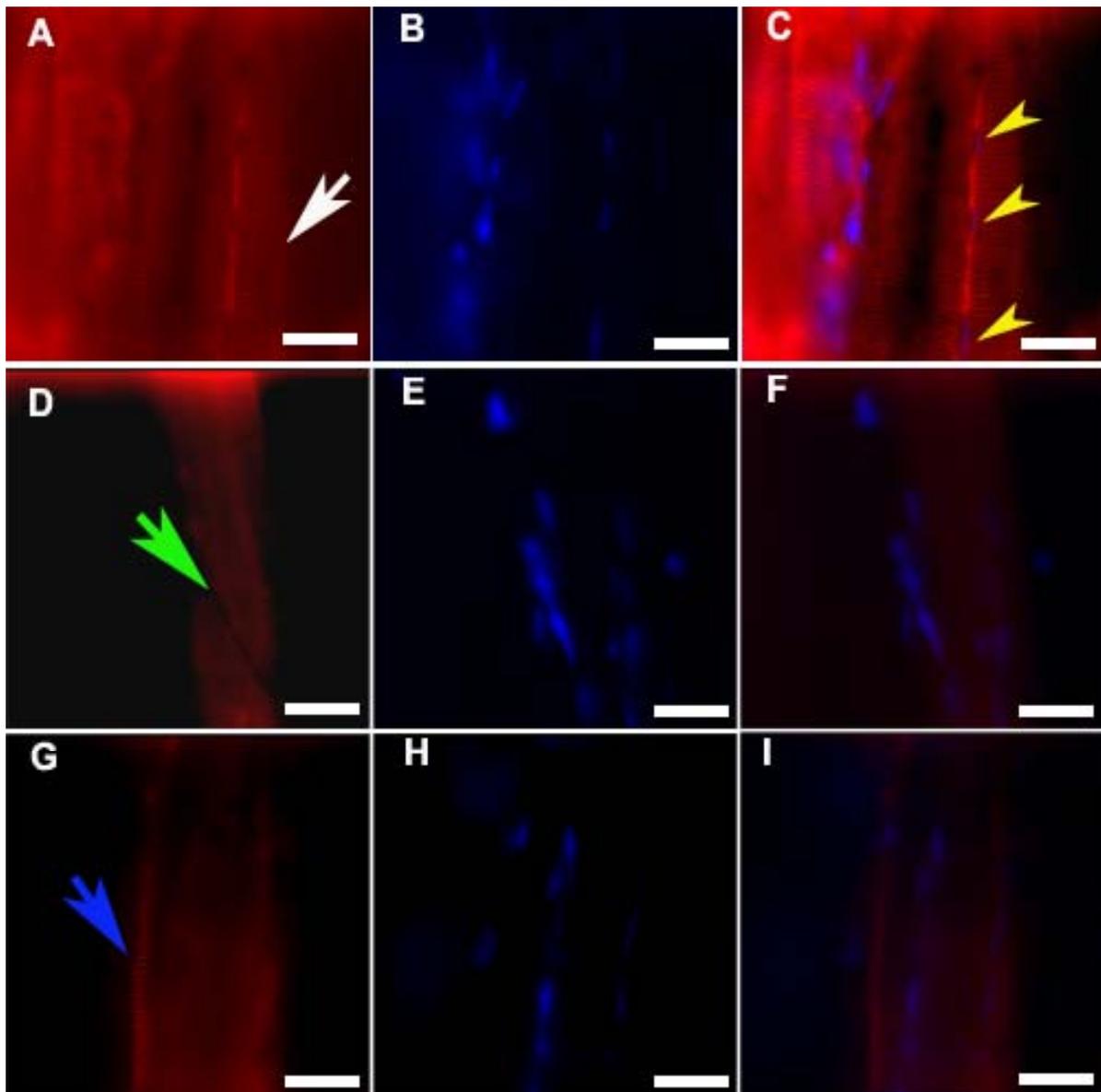


Figura 27: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-nebulina. A seta branca indica marcações de estriações proximais ao sarcolema. (B-E-H) DAPI em azul revela núcleos. (C-F-I) Superposição de duas imagens com marcações com nebulina – note que as cabeças de setas amarelas indicam co-localizações em C. (D) Imunofluorescência com anticorpo anti-nebulina. Estriações proximais ao septo muscular (indicado pela seta verde) estão bem marcadas. (G) Imunofluorescência com anticorpo anti-nebulina - a seta azul indica marcações de estriações no meio da fibra. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 28: Gráfico da periodicidade da marcação de nebulina em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância de um pico ao outro de cada sarcômero = 2,1  $\mu\text{m}$ .

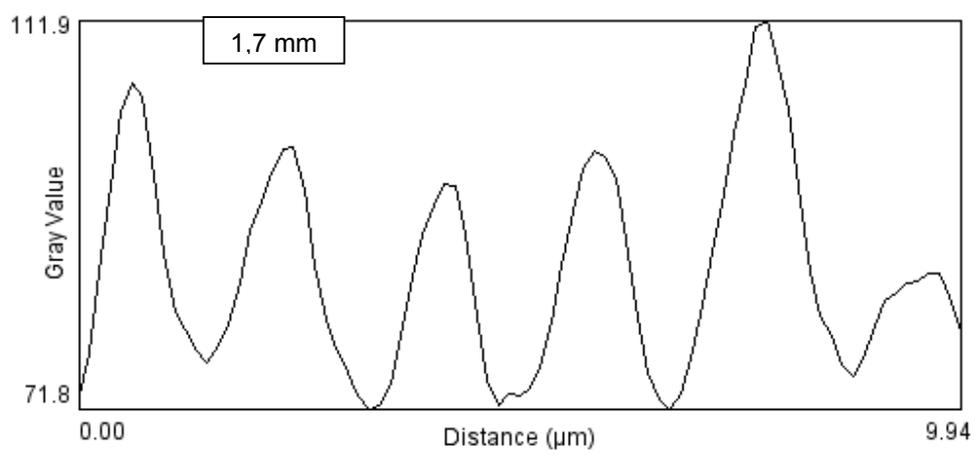
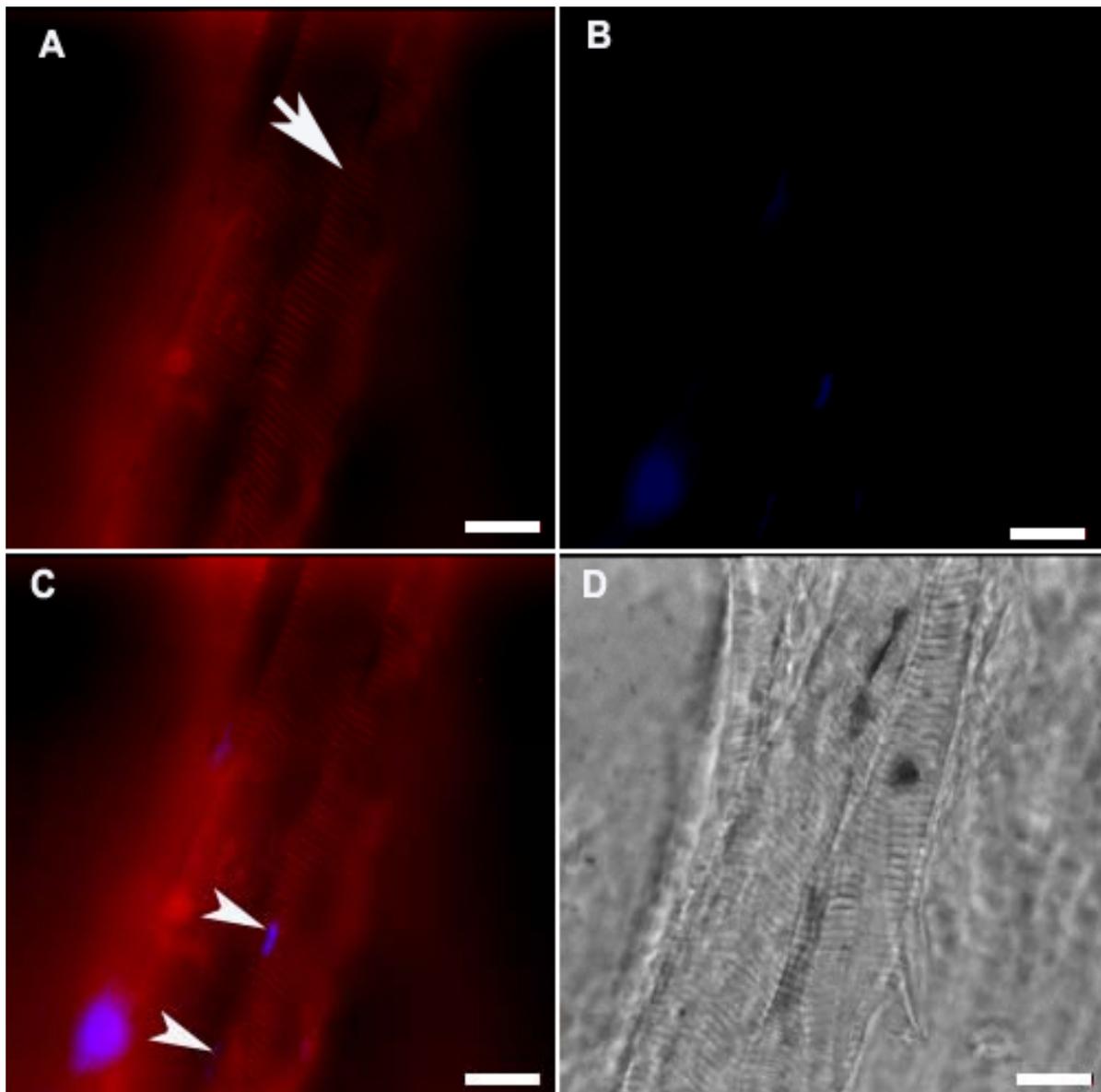


Figura 29: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-alfa-actinina sarcomérica. A seta indica presença de anti-alfa-actinina na Linha Z. (B) DAPI em azul revela núcleos. (C) Superposição das duas imagens anteriores – as cabeças de setas brancas indicam co-localizações. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens. (D) DIC (cinza) de corte longitudinal do músculo de peixe-zebra adulto.

Figura 30: Gráfico da periodicidade da marcação de alfa-actinina em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância de um pico ao outro de cada sarcômero = 1,7 mm.

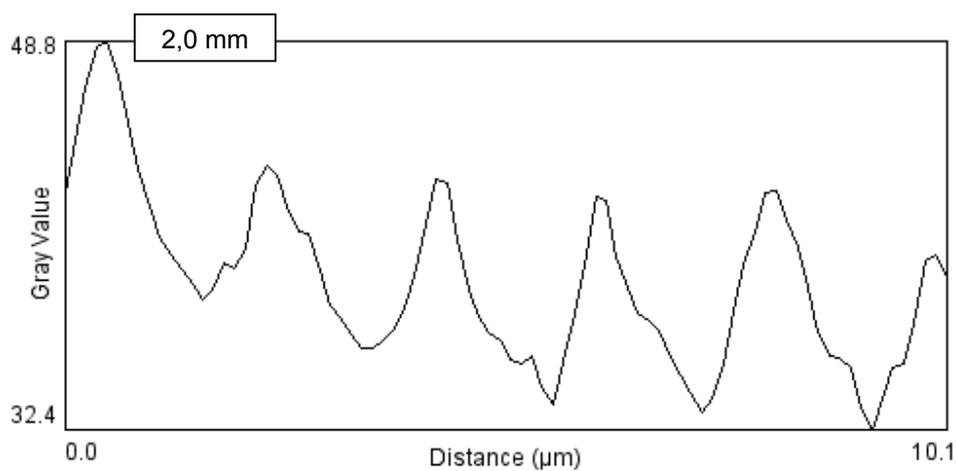
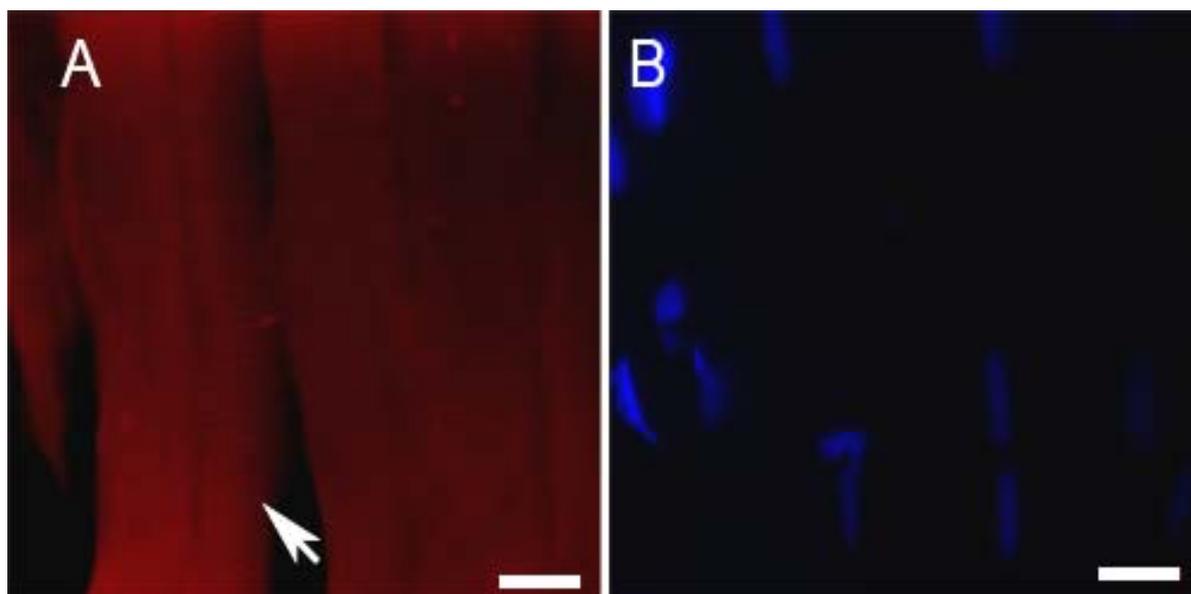


Figura 31: (A) Imunofluorescência com anticorpo anti-miosina tipo II. A seta branca indica presença de miosina do tipo II nas estriações sarcoméricas da banda A. (B) DAPI em azul revela núcleos. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens.

Figura 32: Gráfico da periodicidade da marcação de miosina tipo II em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância de um pico ao outro de cada sarcômero = 2,0  $\mu\text{m}$ .

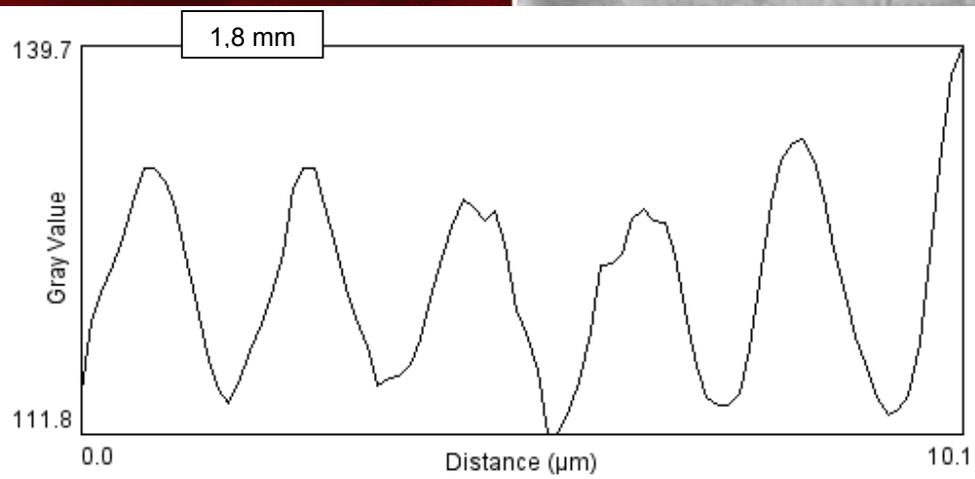
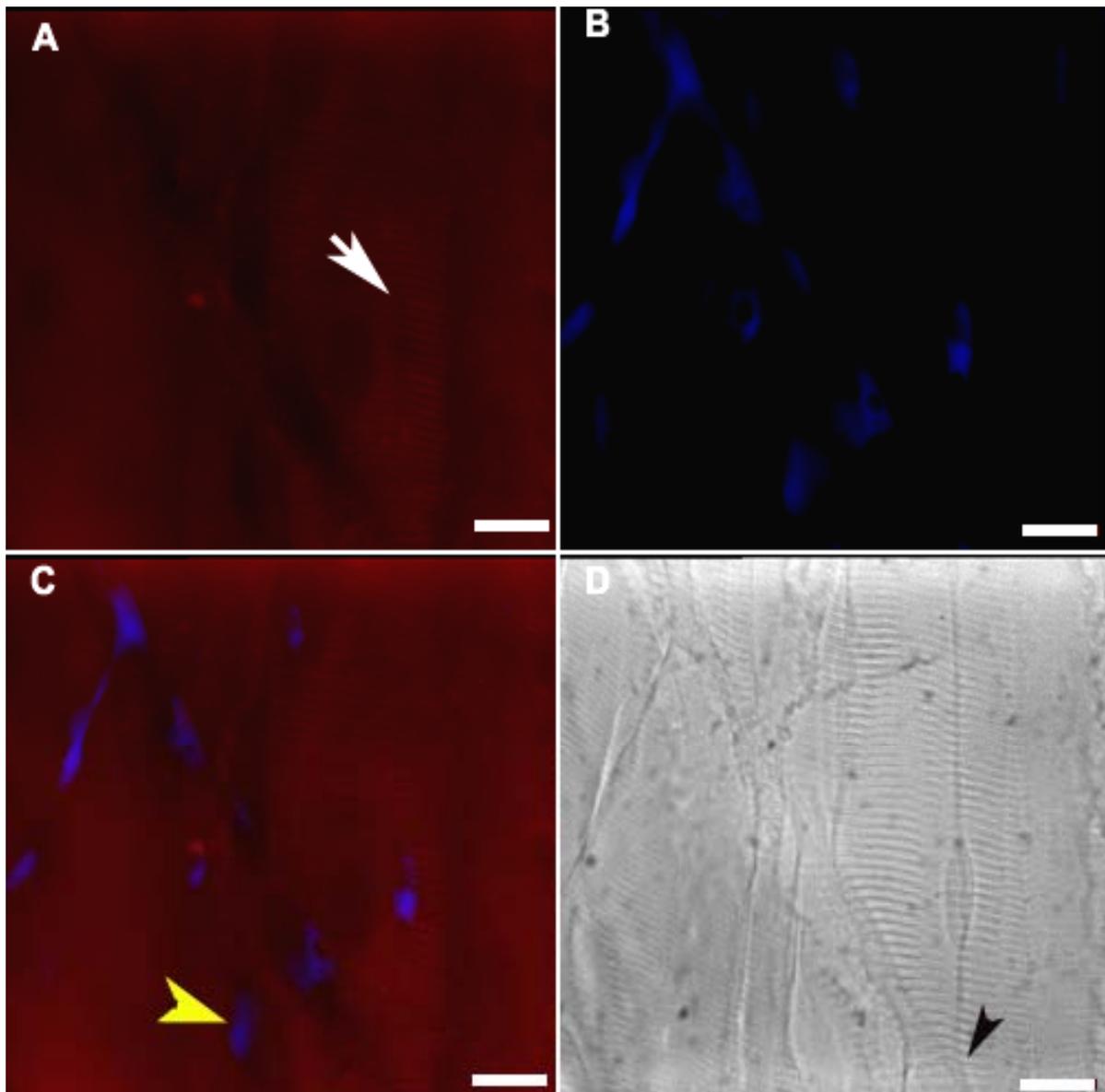


Figura 33: Imunofluorescência com anti-miosina tipo II rápida: a isoforma foi encontrada na banda A, integrando o padrão de fibras de contrações rápida e lenta – indicada pela seta branca. (B) DAPI em azul revela núcleos. (C) Superposição das duas imagens anteriores – a cabeça de seta amarela indica co-localização. Barras = 10  $\mu\text{m}$  são equivalentes para todas as imagens. (D) DIC em corte longitudinal do músculo de peixe-zebra adulto. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Figura 34: Gráfico da periodicidade da marcação de miosina tipo II em cortes de músculo de peixe-zebra adulto. Distância de um pico ao outro de cada sarcômero = 1,8  $\mu\text{m}$ .

Os gráficos (**Figuras 32-34**) demonstrando a periodicidade da marcação de miosina tipo II e de sua isoforma, a miosina do tipo II rápida, em cortes de músculo de peixe-zebra adulto representam a distância entre um pico ao outro de cada sarcômero igual a 2,0 para a primeira e 1,9 mm para a esta última.

Na **Figura 35**, podemos ver em corte transversal e semi-fino do tecido muscular, diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas coradas com azul de toluidina. Este material biológico foi polimerizado em resina hidrofóbica e observado em microscopia de campo claro. Os diferentes tipos de fibras correspondem às diferenças de isoformas protéicas e de atividade contrátil, onde permite-se diferenciar as fibras mais escuras (de contração rápida) das fibras musculares mais claras (de contração lenta).

Nestas etapas houve a tentativa de analisar a periodicidade das estriações encontradas nas nossas marcações de proteínas sarcoméricas, a fim de conhecermos os padrões de distribuição de cada uma destas proteínas no músculo do peixe-zebra. A miofibrila é cilíndrica, possui de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, enquanto que cada unidade sarcomérica que a compõe possui aproximadamente 2,2  $\mu\text{m}$  de comprimento (Caiozzo, 2002). De posse de nossos resultados de imunofluorescências, fizemos gráficos (para maiores detalhes, ver gráficos) que representassem a periodicidade de marcação de cada proteína. Nesses gráficos demonstramos que as periodicidades das proteínas alfa-actinina e desmina foram equivalentes as distancias entre linhas Z e que as marcações das proteínas tropomiosina e troponina T foram equivalentes as periodicidades de bandas I dos sarcômeros. Já a proteína miosina II, bem como sua isoforma, mostraram

periodicidades compatíveis com bandas A dos sarcômeros. Foram feitas medidas entre dois picos consecutivos em cada um dos gráficos. Estas medidas revelaram valores na faixa de 1,7 à 2,3  $\mu\text{m}$  de periodicidade destas diferentes proteínas sarcoméricas.

Para melhor organizar os dados encontrados referentes à distribuição destas proteínas uma tabela foi elaborada detalhando o nome da proteína, o local onde a mesma foi expressa nos cortes do tecido muscular do peixe-zebra em nossos experimentos (**Tabela 5**).

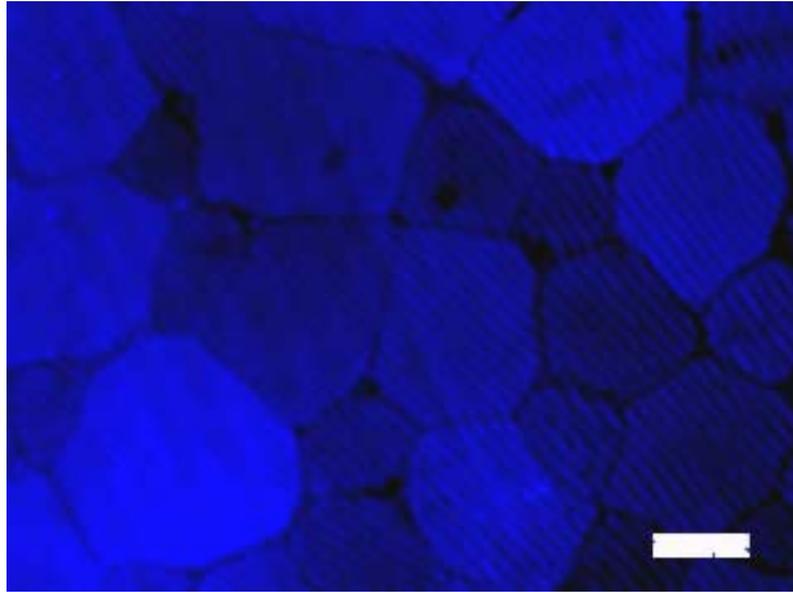


Figura 35: Coloração com azul de toluidina de um corte semi-fino e transversal de músculo visualizado por microscopia óptica de campo claro. Diferentes padrões de colorações revelam diferenças de fibras de contrações rápida e lenta.

Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

| <b>Proteínas Identificadas no Tecido Muscular do Peixe-zebra Adulto</b> | <b>Local</b>  | <b>Média da Periodicidade de Estriações (mm)</b> |         |
|---|---|--|---------|
| Desmina   | Linha Z   | 2,3  | + - 1,0 |
| Tropomiosina  | Banda I   | 1,9  | + - 1,1 |
| Troponina T   | Banda I   | 2,2  | + - 1,1 |
| Titina  | Junções de Banda A e I                              | 1,6  | + - 0,8 |
| Nebulina  | Estriações próximas sarcolema, septo, meio da fibra | 1,7  | + - 1,0 |
| Alfa-actinina   | Linha Z   | 1,7  | + - 1,0 |
| Miosina do tipo II  | Banda A   | 2,0  | + - 1,4 |
| Miosina do tipo II rápida   | Banda A   | 1,8  | + - 1,4 |

Tabela 5: Padrões de proteínas identificadas no tecido muscular do peixe-zebra: resumo referente à distribuição de proteínas identificadas no tecido muscular do peixe-zebra adulto, local e média das distâncias (a partir da linha Z) das periodicidades de estriações sarcoméricas.

## V – DISCUSSÃO

Este estudo de dissertação concentrou-se em uma análise morfológica detalhada do sistema miofibrilar de músculo esquelético de peixe-zebra adulto, através de microscopia óptica de campo claro, microscopia de fluorescência, bem como microscopia eletrônica de transmissão. Algumas características da miogênese no embrião do peixe-zebra já foram descritas (Costa *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003), entretanto, no peixe adulto alguns detalhes necessitavam de estudos e foram então investigados neste trabalho.

Além do sistema contrátil, o sistema mitocondrial foi também estudado nesta dissertação. Isto porque o aparato contrátil é dependente de um aporte energético que vem das mitocôndrias. O papel das mitocôndrias na produção de energia sob a forma de moléculas de ATP já é bem estabelecido. São também numerosos os estudos que demonstram o envolvimento do citoesqueleto durante o movimento e a localização mitocondrial (Suelmamm e Fischer, 2000). Milner e colaboradores (2000) sugerem em seus estudos que há uma associação entre a proteína dos filamentos intermediários desmina e as mitocôndrias em músculo esquelético. Esses estudos evidenciaram que nas fibras do músculo esquelético, as mitocôndrias estão localizadas em pares na linha Z do sarcômero (em toda extensão da miofibrila), diferentemente dos arranjos mitocôndrias encontrados na musculatura cardíaca, os quais estão localizados entre as miofibrilas. No músculo estriado, os filamentos de desmina contornam a linha Z e, possivelmente, têm papel na localização de mitocôndrias entre as miofibrilas (Capetanaki e Milner,

1998). Nos experimentos desta dissertação observamos mitocôndrias amplamente distribuídas tanto em regiões periféricas como em regiões mais centrais intercaladas entre os miofilamentos do tecido muscular do peixe adulto. Outro resultado bastante interessante foi o de identificarmos particularidades do retículo sarcoplasmático, como as cisternas terminais granulares integradas aos túbulos T, formando a tríade muscular no peixe.

Recentes estudos de nosso laboratório demonstraram que os filamentos intermediários de desmina estão associados estável e firmemente à superfície nuclear de células musculares de embrião de galinha cultivadas *in vitro* (Mermelstein *et al.*, 2006). Sob circunstâncias normais, em ratos, o músculo esquelético do adulto é um tecido que apresenta poucos núcleos (Rudnick *et al.*, 2004). Nós constatamos também poucos núcleos nas células musculares maduras do peixe-zebra, e esses núcleos pós-mitóticos estavam localizados na periferia de fibras musculares.

Um dos achados mais interessantes obtidos neste trabalho foi a observação de uma célula com morfologia semelhante à uma célula satélite no músculo do peixe-zebra. Estas células estavam próximas ao núcleo da célula muscular, adjacente à lâmina basal e com perfil de heterocromatina condensada (que refletem sua quiescência mitótica). Já foram descritas células satélites residentes no tecido muscular de ratos (Rudinick & Seale, 2000; Goldring, 2002 *et al.*) e de camundongos adultos (Rudinick *et al.*, 2004).

As estriações das miofibrilas podem ser facilmente observadas por microscopia de luz, onde as faixas claras (isotrópicas) e escuras (anisotrópicas) se alternam (Clark *et al.*, 2004). Identificamos através de microscopia óptica o padrão

de periodicidade de miofibrilas. Já os septos de tecido conjuntivo aparecem sob a forma de “V” no tecido muscular do peixe-zebra adulto. Foi possível nesta dissertação a observação de detalhes ultra-estruturais das miofibrilas, como os filamentos de actina organizados ao redor dos filamentos de miosina em pontes cruzadas no músculo do peixe, através de microscopia eletrônica de transmissão.

A caracterização da distribuição de proteínas em estriações transversais sarcoméricas da miofibrila, em nossos experimentos preliminares, foi um crítico problema em função da autofluorescência endógena (comum em músculo), bem como possíveis marcações inespecíficas atribuídas aos anticorpos secundários. Inúmeros são os estudos referentes à exploração de causas da autofluorescência presente em tecidos. Moléculas endógenas e, naturalmente, presentes em tecidos animais ou não estão associadas à autofluorescência como flavinas (concentradas em mitocôncrias, citoplasma e em outras membranas); NADPH (co-fatores do metabolismo, concentrados em mitocôndrias e presentes no citoplasma); colágeno e elastina (concentradas em tecido conjuntivo); lipofuscina (pigmento granular acumulado em várias células); resíduos de aminoácidos como triptofano, tirosina e fenilalanina (co-fatores do metabolismo, concentrados em mitocôndrias e presentes no citoplasma) entre outras moléculas (Billinton & Knight, 2001). Para uma melhor distinção entre marcações específicas e autofluorescência, alguns estudos sugerem uma análise por microscopia confocal a laser conjugada à avaliação espectral (Billinton & Knight, 2001; Goodell *et al.*, 2004), reconstrução tridimensional (Tokumasu & Dvorak, 2003) ou o tratamento químico para reduzir a autofluorescência e possibilitar a visualização dos antígenos (Gabel & Neumann, 2002). Reagentes químicos como o bórax (Clancy & Cauleer, 1998), a

estreptavidina, a avidina e a biotina (Tokumasu & Dvorak, 2003), e o acetato de amônio (Schnell *et al.*, 1999) foram utilizados e demonstraram serem eficazes para o controle de autofluorescência endógena. As caracterizações das distribuições de proteínas e suas respectivas marcações em áreas de estriações transversais específicas e a preservação da periodicidade das mesmas nas miofibrilas do peixe-zebra foram as etapas mais críticas para a obtenção de resultados confiáveis. A utilização de microscopia confocal conjugada à análise por meio de gráfico espectral foi uma estratégia utilizada, mas pouco viável em nossos experimentos para distinguir a autofluorescência no músculo do peixe. A imunohistoquímica indireta com o uso de anticorpos secundários marcados com peroxidase e com o complexo estreptavidina-avidina-biotina não demonstrou resultado conclusivo em nossas experiências. Além disso, nossos resultados de marcações demonstraram que as lâminas contendo cortes congelados submetidos as lavagens somente com (PBS) e/ou com o bórax não foram satisfatórios para a eliminação de autofluorescência endógena, quando observadas nos três filtros dicróticos azul, verde e U.V. Entretanto, demonstramos que o cloreto de amônio foi eficaz na eliminação de autofluorescência, apenas no filtro equivalente da excitação da rodamina (TRITC) no músculo do peixe. Foi demonstrado na literatura que um subconjunto específico de fibras do músculo esquelético tibial anterior de rato exibe um nível elevado de autofluorescência, quando visualizadas no filtro equivalente da excitação da fluoresceína (Goodell *et al.*, 2004). Acreditamos que a atividade de NADH presente em tipos de fibras oxidativas e glicolíticas, possivelmente interfira na autofluorescência que observamos no filtro para fluoresceína. Porém, através de experimentos com o uso de cloreto de

amônio seguido de coquetel com leite em pó, albumina bovina e soro fetal bovino conseguimos eliminar a autofluorescência no canal de excitação rodamina e ainda eliminar marcações inespecíficas dos anticorpos secundários. De posse dos resultados obtidos padronizamos o protocolo para controle de possíveis marcações inespecíficas e de autofluorescência e prosseguimos com as marcações com os anticorpos primários contra proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto.

É importante ressaltar que não foi possível neste trabalho de dissertação a realização de experimentos de dupla marcação em imunofluorescência de cortes de tecido muscular, uma vez que só podíamos utilizar anticorpos secundários marcados com rodamina (devido ao problema de autofluorescência no canal de fluoresceína). Desta forma, não foi possível correlacionar e comparar em um mesmo experimento marcações para duas proteínas.

Iniciamos nossas marcações com a análise da proteína dos filamentos intermediários desmina. Filamentos intermediários de desmina são específicos de tecidos musculares (ver revisão por Costa *et al.*, 2004). A principal função da desmina é relacionada a um papel estrutural no músculo, integrando as linhas Z dos sarcômeros (Lieber *et al.*, 2004). Em camundongos transgênicos, sem expressão de desmina, foram detectados defeitos severos em mitocôndrias nos diferentes tipos de fibras musculares (Milner *et al.*, 2000). São descritas interações entre a desmina e estruturas subcelulares, como os costâmeros (Ervasti, 2003), os núcleos (Mermelstein *et al.*, 2006) e as linhas Z (Costa *et al.*, 2004). Em nossos experimentos identificamos a desmina nas linhas Z do músculo esquelético do peixe-zebra adulto, possivelmente associada à proteína alfa-actinina.

Alfa-actinina, proteína associada à actina, é descrita na literatura como estando presente nas linhas Z de células de músculo estriado esquelético de (Costa *et al.*, 2004), sendo imprescindível para a miofibrilogênese. Em tecidos de mamíferos, aves e peixes, a alfa-actinina foi preservada evolutivamente. Demonstramos a presença de alfa-actinina marcando estriações nas regiões de linhas Z em cortes longitudinais do músculo do peixe-zebra adulto.

A seguir partimos para a investigação de duas proteínas acessórias da actina: a tropomiosina e a troponina. A tropomiosina é uma proteína estrutural conjugada à actina que possui várias isoformas específicas para vários tecidos, inclusive em humanos e em ratos (Perry, 2001). Perturbações na expressão de isoformas de tropomiosinas induzem à anormalidades cardíacas severas, incluindo disfunção da contratilidade (MacGowan *et al.*, 2001). Em camundongos transgênicos, a mutação de alfa-tropomiosina lenta afeta a maturação, a hipertrofia e a força do músculo (Hardeman *et al.*, 2000). Foi descrito em trabalho anterior de nosso laboratório, que embriões do peixe-zebra apresentam as proteínas tropomiosina e troponina estriadas desde os somitos mais jovens (Costa *et al.*, 2002). Nossos achados destacam a marcação expressiva do anticorpo anti-tropomiosina sarcomérica em estriações de bandas I dos sarcômeros do peixe-zebra adulto. Betto e colaboradores (2007) demonstraram que isoformas destas proteínas contribuem para a função contrátil no músculo sóleo de rato. Já a troponina é uma proteína associada à actina e tem um papel regulatório no músculo estriado. Existem 3 isoformas de troponina no músculo: a C (responsável pela regulação de cálcio), a I (com função inibitória da ligação da actina à miosina) e a T (que se liga à tropomiosina). Mutações em isoformas de troponina T humana e ratos foram

associadas à ocorrências de cardiomiopatias (Takahashi-Yanaga *et al.*, 2001; Brotto *et al.*, 2006). Trabalhos anteriores de nosso laboratório (Costa *et al.*, 2002), demonstraram que a troponina T apresenta-se estriada em embriões de peixes, em contraste com sua organização mais tardia em miofibrilas observadas *in vitro*. Nós confirmamos a presença da proteína troponina T no tecido muscular do peixe-zebra adulto, integrando as bandas I dos sarcômeros. Neste trabalho de dissertação, identificamos as duas proteínas em estriações transversais no tecido muscular do peixe-zebra adulto, integrando áreas de bandas I de actina.

A próxima proteína que estudamos foi a titina, uma proteína gigante e multifuncional presente em tecidos musculares. Ela se distribui nos sarcômeros desde a linha média (linha M) até as linhas Z, ou seja, preenchendo toda a extensão do sarcômero. Foi descrito que mutantes para titina no peixe-zebra causam miopatias semelhantes àsquelas vistas em humanos (Xu *et al.*, 2002). Neste trabalho, comprovamos a presença de titina em áreas de estriações sarcoméricas compatíveis com a extensão da linha M até a linha Z no músculo do peixe-zebra adulto.

Além da titina, existe outra proteína gigante do músculo: a nebulina. Nebulina participa da regulação do comprimento do sarcômero durante o acoplamento da tropomiosina na superfície da actina (Lukoyanova *et al.*, 2002). Isoformas de nebulina foram observadas em cardiomiócitos de galinha, rato, carneiro e boi (Ogut *et al.*, 2003). Em nossos resultados observamos a presença de nebulina em áreas de estriações próximas ao sarcolema, em estriações próximas aos septos musculares e marcadas com bastante evidência no meio da fibra muscular.

Por fim estudamos a presença de miosina do tipo II, que é a miosina convencional presente em células musculares. A miosina é uma das principais proteínas presentes nos sarcômeros e ela se localiza nas bandas A. Nós confirmamos a presença de miosina em áreas sarcoméricas de bandas A. Resolvemos também investigar a presença no músculo do peixe de isoformas típicas de fibras musculares rápida. Localizamos a isoforma de miosina rápida em cortes longitudinais do músculo do peixe em áreas que correspondem às bandas A de estriações transversais sarcoméricas. Existem tipos de fibras musculares que são classificadas quanto a sua fisiologia contrátil: fibras mais escuras são as de contração rápida das fibras musculares e fibras mais claras são as de contração lenta. Estas diferenças correspondem às diferenças de isoformas protéicas (não só da miosina) e de atividade contrátil. A identificação de fibras rápidas nos nossos cortes de músculo esquelético de peixe-zebra adulto sugere que estes cortes devam ser de tecido muscular mais profundo do peixe, pois já foi descrito que fibras lentas no músculo do peixe-zebra são as mais superficiais e as fibras rápidas são as mais profundas (Roy *et al.*, 2001). No futuro tentaremos obter cortes mais superficiais do músculo do peixe para podermos ter os dois tipos de fibras e poder assim comparar a expressão de diferentes proteínas em fibras rápidas e lentas.

É importante também ressaltar que ao analisarmos a periodicidade das marcações de proteínas sarcoméricas através de gráficos, foi possível confirmarmos que as proteínas estudadas se apresentaram todas com padrões compatíveis com os esperados para suas localizações nas miofibrilas, ou seja,

todos repetitivos e com os distanciamentos (a partir da linha Z) previstos para cada proteína.

## VI – CONCLUSÕES

1 - Foi possível nesta dissertação obter um protocolo de fixação do músculo esquelético do peixe-zebra com isopentano refrigerado em nitrogênio líquido preservando-se a estrutura das miofibrilas, possibilitando assim o estudo da periodicidade de estriações transversais sarcoméricas;

2 - Bloqueios de sítios aldeídicos livres e inibição de marcações inespecíficas foram imprescindíveis ao estudo da presença e distribuição de proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto no músculo do peixe-zebra;

3 - A autofluorescência foi uma limitação para a realização de duplas marcações de fluorescência nesse modelo biológico;

4 - Foram observadas mitocôndrias amplamente distribuídas no sarcoplasma do peixe-zebra adulto;

5 - Septos de tecido conjuntivo em forma de chevron (“V”) puderam ser evidenciados com clareza no tecido muscular do peixe-zebra;

6 - Foram visualizados por meio de microscopia eletrônica: retículo sarcoplasmático, túbulos T e tríades nos cortes de músculo do peixe-zebra;

7 - Observamos que as células musculares maduras apresentam poucos núcleos e estes se encontram distribuídos periféricamente;

8 - Sugerimos a presença de poucas células satélites com heterocromatinas condensadas típicas de células quiescentes;

9 - Detalhes da disposição espacial dos filamentos de actina e de miosina foram visualizados por microscopia eletrônica de transmissão;

10 - A proteína dos filamentos intermediários desmina foi observada na linha Z de miofibrilas no músculo do peixe adulto;

11 - A proteína alfa-actinina foi localizada na linha Z de miofibrilas, possivelmente, interconectando os microfilamentos à esta estrutura;

12 - As proteínas troponina T e tropomiosina foram localizadas integrando as bandas I das miofibrilas;

13 – Nebulina foi demonstrada nas estriações proximais ao sarcolema, bem como no meio da fibra e nas estriações proximais ao septo;

14 – Titina foi encontrada em áreas de estriações sarcoméricas compatíveis com regiões de junções entre bandas A e I.

15 - Miosina do tipo II foi encontrada em bandas A;

16 - A isoforma de miosina de fibras do tipo rápido foi localizada nas banda A, sugerindo a presença de fibras rápidas nos nossos cortes de tecido muscular do peixe-zebra;

## VII – PERSPECTIVAS

1. Estabelecer um protocolo para o controle de ligações inespecíficas e autofluorescência para o canal de emissão/excitação de fluoresceína;
2. Avaliar tridimensionalmente os resultados por meio de microscópio óptico confocal;
3. Obter cortes ultrafinos viáveis para imunomarcações;
4. Quantificar a área ocupada por mitocôndrias no músculo esquelético do peixe-zebra adulto;
5. Quantificar os núcleos.

## VIII - BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Watson, J. (2002). *Molecular Biology of The Cell – Quarta Edição – Editora Garland.*
- Betto, D., Esposito, A., Germinario, E., Zanin, M., Palade, P. T. (2007). Isoform switching in myofibrillar and excitation-contraction coupling proteins contribute to diminished contractile function in regenerating rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 10: 1152-1291.
- Billington, N., Knight A.W. (2001). Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous. *Anal. Biochem.* 291: 157-197.
- Brand-Saberi, B., Müller, T.S., Wilting, J. (1996) Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev. Biol.* 179:303.
- Brotto, M.A., Biesiadecki, J., Brotto, L.S., Nosek, T. M., Jin, J. (2006). Coupled expression of troponina T and troponi I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290: 567-576.
- Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Gen. Devel.* 16: 525-532.
- Caiozzo, V.J., (2002). Plasticity of skeletal muscle phenotype: mechanical consequences. *Muscle Nerve.* 26: 740-768.
- Capetanaki, Y., Milner, D. (1998). Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Subcell. Biochem.* 31: 463-495.
- Carlsson, L., Thornell, L.E. (2001). Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol. Scand.* 171: 341-348.
- Carlsson, L., Thornell, L.E. (2004). Evidence for myofibril remodeling as opposed to myofibril damage in human muscles with DOMS: an ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Histochem. Cell Biol.* 121: 219-227.
- Centner, T., Yaho, J., Kimura, E., McElhinny, A.S., Pelin, K., Witt, C.C., Bang, M.L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C.C., Sorimachi, H., Labeit, S.

- (2000). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J. Mol. Biol.* 306: 717-26.
- Clancy, B., Cauller, L.J. (1998). Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J. Neur. Methods.* 83: 97-102.
- Clark, K. A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C. (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18: 637-706.
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell – A Molecular Approach – 2 ed.* 2005. Atheneu.
- Cooper, J.A., Schafer, D.A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 97-103.
- Cossu, G., Borello, U. (1999). Wnt signaling and the activation of miogenesis in mammals. *Embo J.* 18: 6867-6872.
- Costa, M. L., Escaleira, R. C., Manasfi, M., Souza, L. F., Mermelstein, C. S. (2003). Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 1117-1120.
- Costa, M. L., Escaleira, R. C., Rodrigues, V. R., Manasfi, M., Mermelstein, C. S. (2002). Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech. Dev.* 116: 95-104.
- Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A. Oliveira, F., Mermelstein, C.S. (2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 1819-1830.
- Cox, PR, Siddique, T. Zoghbi, H.y. (2001). Genomic organization of tropomodulins 2 and 4 and unusual intergenic and intraexonic splicing of YL-1 and tropomodulina 4. *Biomed. Cent. Genomics.*
- Craig, R., Lehman, W., (2001). Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, in interacting thick and the filaments. *J. Mol. Biol.* 311:1027:1036.
- Dooley, K. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 252-256.

- Eisenberg, B.R., Milton, R.L. (1984). Muscle fiber termination at the tendon in the frog's sartorius: a stereological study. *Am. J. Anat.* 171: 273-84.
- Ervasti, J.M. (2003). Costameres: the Achilles' hell of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* 278: 13591-13594.
- Esser K., Nelson T., Lupa-Kimball V., Blough E. (1999). The CACC box and myocyte enhancer factor-2 sites within the myosin light chain 2 slow promoter cooperate in regulating nerve-specific transcription in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 274: 12095-102.
- Fernandez, C., Figarella-Branger, D., Allia, P., Harle, J.R., Pellissier, J.F. (2002). Colchicine myopathy: vacuolar myopathy with selective type I muscle fiber involvement. An immunohistochemical and electron microscopic study of two cases. *Acta Neuropathol.* 103: 100-6.
- Flick, M.K., Konieczny, S.F. (2000). The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta I-spectrin. *J. Cell Sci.* 113: 1553-1564.
- Fowler, V. M., Mckeom, C.R. Fischer, R.S. (2006) Nebulin: does it measure up as ruler? *Curr. Biol.* 16: 18-20.
- Gabel, D., Neumann, M.(2002). Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 437-439.
- Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. 6<sup>th</sup> edition. Sinauer Associated Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Goldring, K., Partridge, T., Watt., D. (2002). Muscle stem cells. *J. Pathol.* 197: 457-467.
- Goodell, M.A., Jackson, K.A. (2004). Skeletal fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells* 22: 180-187.
- Hardeman, E.C., Corbett, M. A., Robinson, S., Dungalison, G. F., Yang, N., Joya, J. E., Stewart, A. W., Schnell, C., Gunning, P. W., North, K.N. (2001). A mutation in alfa-tropomyosin slow affects muscle strength, maturation and hypertrophy in a mouse model for nemaline myopathy. *Human Mol. Genetics* 10: 317-328.

- Hernandes, O.M., Housmans, P.R., Potter, J.D. (2001). Invited review: pathophysiology of cardiac muscle contraction and relaxation as a result of alterations in thin filament regulation. *J. Appl. Physiol.* 90: 1125-1136.
- Herrmann, H., Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 749-89.
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Muller, E. Schmitt, I, et al. (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE) – and constitutive transport element (CTE) – containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J. Cell Biol.* 152: 895-910.
- Hugnes, S.M., Chi, M.M.Y., Lowry, O.H., Gundersen, K. (1999). Miogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscle of transgenic mice. *J. Cell Biol.* 145: 633-642.
- Huse, M., Kuriyan, J.. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109:275-282.
- Huxley, A. E., Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction interference microscopy of living muscle fibers. *Nature* 173: 971-973.
- Huxley, H.E., Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle contraction and their structural interpretation. *Nature* 173: 973-976.
- Huxley, A.F. (2000a). Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *J. Biomech.* 33: 1189-95.
- Huxley, A.F. (2000b). Mechanics and models of the myosin motor. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 355: 433-440.
- Ishikawa H. (1983). Fine structure of skeletal muscle. *Cell Muscle Motil.* 4: 1-84.
- Kubis, H., Haller, E., Wstzel, P., Gros., G. (1997). Adult fast myosin pattern and Ca<sup>2+</sup> - induced slow myosin pattern in primary skeletal muscle culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4205-4210.
- Larsson L. (1978). Morphological and functional characteristics of the ageing skeletal muscle in man. A cross-sectional study. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 457: 1-36.

- Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., et al. (2000). Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J. Mol. Biol.* 302: 593-606.
- Lehman, W., Rosol, M., Tobacman, L.S., Craig, R. (2001). Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three-dimensional reconstruction. *J. Mol. Biol.* 307: 739-344.
- Li, J., Mayne, R., Wu, C. (1999). A novel muscle-specific (integrin binding protein) (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* 147: 1391-1398.
- Lieber, R. L., Shah, S. B., Davis, J., Weisleder, N. Kostavassili, I., McCulloch, A.D., Ralston, E., Capetanaki, Y. (2004). Structural and functional roles of desmin mouse skeletal muscle during passive deformation. *Bio. Jour.* 86: 29993-3008.
- Linke, A. W., Prado, L.G., Makarenko, I., Andresen, C., Krüger, M., Opitz, C.A. (2005). Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 126: 461-480.
- Lukoyanova, N., VanLoock, M.S., Orlova, A., Glakin, V.E., Wang, K., Egelman, E.H. (2002). Each actin subunit has three nebulin binding sites. Implications for steric blocking. *Curr. Biol.* 12: 383-88.
- Ma, K., Wang, K. (2006). Titin as a giant scaffold for integrating stress and Src homology domain 3-mediated signaling pathways: the clustering of novel overlap ligand motifs on the elastic PEVK segment. *J. Biol. Chem.* 281: 27539-56.
- MacGowan, G.A., Du, C., Wieczorek, D.F., Koretsky, A.P. (2001). Compensatory changes in Ca<sup>2+</sup> and myocardial O<sub>2</sub> consumption in beta tropomyosin transgenic hearts. *Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.* 281: 2539- 48.
- Maxwell, L.C., Faulkner, J.A., Lieberman, D.A. (1973). Histochemical manifestations of age and endurance training in skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 224: 356-361.
- Mermelstein, C.S., Andrade, L.R., Portilho, D.M., Costa, M.L. (2006). Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts. *Cell Tissue Res.* 323: 351-7.

- Milner, D.J., Mavroidis M., Weisleder N., Capetanaki, Y. (2000). Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J. Cell Biol.* 150: 1283-1297.
- Moore, D. H., Copenhaver, W.M., Ruska, H. (1956). Electron microscopic and histochemical observations of muscle degeneration after tourniquet. *J. Biophysics Biochem. Cytol.* 2: 6-11.
- Moore, K. L. (2007). *Anatomia orientada para a clínica. – Sétima edição – Guanabara Koogan.*
- Nüsslen-Volhard, C., Dahm, R. *Zebrafish book: practical approach.* Oxford University Press.
- Ogut, O.M., Hossain, M., Jin, J. (2003). Interactions between nebulin-like motifs and thin filament regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 3089 - 3097.
- Patton, J.G., Flynt, A.S., Li, N., Thatcher, E.J., Solnica-Krezel, L. (2007). Zebrafish miR-214 modulates hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature* 39: 259: 264.
- Perry, S.V. (2001). Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22: 5-49.
- Petruzelli, L., Takami, M., Humes, H.D. (1999). Structure and function of cell adhesion molecules. *Am. J. Med.* 106: 467-476.
- Quacha, N.L., Rando, T. A. (2006). Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Developmental Biology.* YDBIO-02366 .
- Regginani. C., Bottinelli, R., Stienen, G.J. (2000). Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol. Sci.* 15: 26-33.
- Riley, D.A., Allin, E.F. (1973). The effects of inactivity, programmed stimulation, and denervation on the histochemistry of skeletal muscle fiber types. *Exp. Neurol.* 40: 391-413.
- Rivero, J.L.L., Linnane, L., Serrano, A.L.,(1999). Distribution of cast myosin heavy chain-based muscle fibres in the gluteus medius of untrained horses: mismatch between antigenic and ATPase determinants. *J. Anat.* 194: 363-372.

- Roy S, Wolff C, Ingham PW. (2001). The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes Dev.* 15: 1563-1576.
- Rudnicki, M.A, McKinnel, I.W. (2005). One source for muscle. *Developmental Biology. Nature.* 435: 16.
- Rudnicki, M., Charge, S. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84: 209-238.
- Rudnicki, M., Seale, P. (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 218: 115-124.
- Sanger, J.W., Sanger, J.M. (2002). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin. Orthopaedics Related Res.* 403S: 153-162.
- Schnell, S.A., Staines, W. A., Wessendorf, M. W.(1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *Journ. Histochem. Cytochem.* 47: 719-730.
- Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.-* 496: 3-22.
- Shi, X., Garry, D. J. (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Dev.* 20: 1692-1708.
- Sirca, A., Kostevc, V. (1985). The fibre type composition of thoracic and lumbar paravertebral muscles in man. *J. Anat.* 141: 131-137.
- Small J.V., Kaverina, I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity . *Currenty Opinion in Cell Biology.* 15: 40-47.
- Suelmann, R., Fischer, R. (2000) Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45: 42-50.
- Takahaschi-Yanaga, F., Ohtsuki, I., Morimoto, S. (2001). Effects of troponin T mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy on regulatory functions of other troponin subunits. *J. Biochem.* 130: 127-131.
- Tokumasu, F., Dvorak, J. (2003). Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J. Microscopy.* 211: 256-261.

- Vale, R.D., Miligan, R.A., (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288: 88-95.
- Westerfield, M., Ochi, H. (2007). Signaling networks that regulate muscle development: lessons from zebrafish. *Develop. Growth. Differ.* 49: 1-11.
- Xu, X., Meiler, S.E., Zhong, T.P., Mohideen, M., Crossley, D.A. (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat. Genet.* 30: 205-9.
- Yan, Z., et al. (2001). Regulation elements governing transcription in specialized myofiber subtypes. *J. Biol. Chem.* 276: 20-18.
- Yang, Q. Osinska, H., Klevitsky, R., Robbins, J. (2001). Phenotypic deficits in mice expressing a myosin binding protein C lacking the titin and myosin binding domains. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1649-1658.
- Zhang, J.M., Wei, Q., Zhao, X., Paterson, M.B. (1999). Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.* 18: 926–933.
- Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P., Xu, X. (2005). Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. *Marine Biotech.* 8: 139-148.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)