

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Raquel Santilone Bertaglia

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

Orientadora: Dra Maeli Dal Pai Silva

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

“AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DO
MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA”

Raquel Santilone Bertaglia

Orientadrea: Dra Maeli Dal Pai Silva

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

Orientadora: Dra Maeli Dal Pai Silva

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Bertaglia, Raquel Santilone.

Avaliação bioquímica, morfológica e funcional do músculo estriado esquelético de ratos na insuficiência cardíaca / Raquel Santilone Bertaglia. - Botucatu, 2011

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

Orientador: Maeli Dal Pai Silva

Capes: 20603002

1. Insuficiência cardíaca. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Músculos.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Insuficiência cardíaca; Miogenina; Monocrotalina; Músculo estriado esquelético; MyoD.

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À Deus, que com toda certeza está sempre ao meu lado guiando meus passos e iluminando meu caminho.

Aos meus queridos e amados pais, Nilson e Marilda, pelo amor, carinho e compreensão. Por não medirem esforços para a minha educação e formação profissional e por acreditarem em mim, tornando possível a realização dos meus sonhos.

Ao meu marido Osvaldo Cesar, por estar ao meu lado, sempre me incentivando e acalmando, renovando minha esperança a cada dia.

Agradecimentos

À Deus, por me acompanhar, me proteger e me amparar sempre. Obrigada por estar ao meu lado e por permitir a presença de pessoas especiais na minha vida.

À orientadora, mestre e amiga Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela competência, paciência e carinho com que acompanhou todas as etapas desse trabalho e por ter confiado em mim. Obrigada por ter dividido comigo um pouquinho do brilho, dessa infinita luz da sabedoria, que existe dentro de você.

Aos meus pais, referências de sabedoria e perseverança. Obrigada por acreditarem que o conhecimento é a melhor herança e por me apoiarem em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional.

Ao meu marido Osvaldo Cesar pelo companheirismo e paciência. Seu incentivo, carinho e amor foram essenciais para eu trilhar esse caminho até o fim.

Aos meus irmãos Daniel e Angélica por todo amor, carinho e amizade, em todos os momentos. Vocês são motivos de muito orgulho e inspiração.

Aos meus familiares pela grande ajuda, compreensão e força, que encontrei, nos momentos difíceis.

À Professora Dra. Márcia Gallacci e aos amigos Walter, Cicília, Fábio e Fernanda, do departamento de farmacologia, que com muita dedicação me ajudaram com a análise funcional. Agradeço pela amizade, colaboração e troca de conhecimentos.

À Professora Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes, do departamento de Química e Bioquímica, pelo auxílio nas análises bioquímicas.

Aos Professores Dr. Carlos Roberto Padovani e Sergio Augusto Rodrigues do Departamento de Bioestatística-UNESP-Botucatu pelo auxílio estatístico.

Ao Dr. Carlos Antônio Cicogna por sua orientação em diversas etapas do desenvolvimento desta pesquisa e por compartilhar suas experiências.

Aos membros da banca de defesa: Dra. Maeli Dal Pai Silva, Dr. Jesus Carlos Andreo e Dr. Walter Cavalcante pela disponibilidade e atenção para participarem desta avaliação.

À Professora Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes, à Professora Dra. Márcia Gallacci e ao Professor Dr. Robson Francisco Carvalho por comporem minha banca de qualificação ao mestrado, pela atenção e principalmente pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores do Programa de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada que participaram, positivamente, na minha formação científica durante estes dois anos de mestrado, agradeço pelo aprendizado e por compartilhar suas experiências profissionais.

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

Aos técnicos de laboratório, José Eduardo e Ricardo pelo auxílio profissional e amizade.

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

À Luciana, secretária do Departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu, pela atenção e por todo auxílio.

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

À Capes pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento desse trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	09
Abstract	11
I – INTRODUÇÃO	12
1.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético	12
1.2. Plasticidade do Músculo Esquelético	17
1.3. Insuficiência Cardíaca	17
1.4. Alterações nas fibras do Músculo Esquelético na Insuficiência Cardíaca	18
II – OBJETIVO	22
III- MATERIAIS E MÉTODOS	23
IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
V – CAPÍTULO 1: Differential morphofunctional characteristics in fast and slow muscles in a monocrotaline-induced heart failure	40

Resumo:

A insuficiência cardíaca (IC) está associada à miopatia dos músculos esqueléticos dos membros, com perda da massa muscular, diminuição na proporção da cadeia pesada das miosinas do tipo I (MHCI), aumento na proporção da cadeia pesada das miosinas do tipo II (MHCII), decréscimo do metabolismo oxidativo e alterações nos fatores de regulação miogênica (MRFs). Na IC também ocorre aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética, o qual está relacionado às mudanças estruturais, morfológicas e funcionais. Nesse estudo, nós investigamos e comparamos as características morfofuncionais dos músculos Sóleo (SOL), lento e com predomínio de fibras oxidativas e Extensor Digitorum Longus (EDL), rápido e com predomínio de fibras glicolíticas em ratos com IC induzida pela monocrotalina. Foram utilizados ratos Wistar, machos (90 a 100 g), divididos em 2 grupos: controle (CT) e insuficiência cardíaca (IC), induzida pela injeção de dose única de monocrotalina (MCT, 30mg/Kg i.p.). Após 22 dias da injeção da MCT, quando os animais apresentaram sinais de IC, todos os animais foram sacrificados e pesados. Os músculos SOL e EDL foram retirados, pesados e processados para as análises morfológicas, moleculares, bioquímicas e funcionais. A expressão gênica da MyoD e miogenina foram determinadas usando qRT-PCR, as isoformas de MHC foram determinadas por eletroforese em gel de poliácridamida, a frequência e área de secção transversal dos tipos de fibra foram analisadas pela reação histoquímica de ATPase miofibrilar (mATPase). Foram realizados estudos bioquímicos para a determinação do hidroperóxido de lipídeo (HL), da glutatona peroxidase (GSH-Px) e da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); o estudo miográfico foi realizado para determinar a força máxima de contração, o tempo de contração e de relaxamento e a resistência à fadiga. Todos os ratos tratados com MCT mostraram sinais de IC (hipertrofia de átrio e ventrículo direitos, derrame pleural, ascite e hepatomegalia) e atrofia dos músculos SOL e EDL, confirmada pela diminuição da área de secção transversal dos tipos de fibras (Tipos I, IC, IIC e IIA no SOL e I, IIC, IIA, IIA/D e IIDB no EDL). No grupo com IC, a frequência das fibras IIC diminuiu e o tempo de relaxamento da contração muscular aumentou no músculo SOL; a expressão gênica de Miogenina diminuiu no músculo SOL enquanto a de MyoD diminuiu no músculo EDL. A concentração de Hidroperóxido de lipídeo (HL) aumentou e a atividade das enzimas antioxidantes Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) e Superóxido dismutase (SOD) diminuiu apenas no músculo SOL dos animais com IC; no músculo EDL, não houve alteração nas propriedades contráteis, na expressão gênica, na concentração de HL e na atividade das enzimas antioxidantes. Nos grupos estudados, não houve alteração nas MHCs nos músculos SOL e EDL. Em conclusão, a IC induzida por monocrotalina induziu alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais

principalmente no músculo SOL, músculo de contração lenta e constituído predominantemente por fibras oxidativas. Embora novos estudos sejam necessários para melhor esclarecer os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da insuficiência cardíaca, nossos resultados contribuem para a compreensão das alterações músculo-específicas que ocorrem nessa síndrome.

Abstract

Heart failure (HF) is characterized by a limited exercise tolerance, skeletal muscle myopathy with atrophy, shift toward fast muscle fiber and myogenic regulatory factors (MRFs) changes. Reactive oxygen species (ROS) also contribute to target organ damage in the heart failure syndrome. In this study, we investigated and compared the morphofunctional characteristics in SOL, a slow oxidative muscle and EDL, a fast glycolytic muscle in a monocrotaline-induced heart failure. Two groups of rats were studied: control (CT) and Heart Failure (HF), induced by a single intraperitoneal injection of monocrotaline (MCT, 30mg/Kg). MyoD and myogenin expression were determined by using qRT-PCR, MHC isoforms were studied by using polyacrylamide gel electrophoresis, muscle fiber-type frequency and cross sectional area (CSA) were analyzed by myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase). Biochemical study were performed to determine: lipid hydroperoxide (LH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD); myographic study was performed to analyze: amplitude, rise time, fall time and fatigue resistance in SOL and EDL muscles. All monocrotaline treated rats showed signs of HF (atrium and right ventricular hypertrophies, pleural and pericardial effusions, and congested liver). HF group showed SOL and EDL muscles atrophy, confirmed by CSA decreased in muscle fiber types (types I, IC, IIC and IIA in SOL and I, IIC, IIA, IIA/D and IIDB in EDL muscles); the frequency of IIC fiber type and the fall time of muscle contraction increased only in SOL muscle; he myogenin mRNA expression was lower only in the SOL muscle and the MyoD mRNA expression decreased only in EDL muscle. HF group also presented the concentration of lipid hydroperoxide increased, superoxide-dismutase and glutathione peroxidase activity reduced only in SOL muscle; EDL muscle showed the contractile properties, concentration of HL and antioxidant enzyme activity not changed. In the groups studied, the percentage distribution of MHCs did not alter in both muscles. In conclusion, our results indicate that the HF induced by monocrotaline promoted biochemical, morphological and functional changes, more prominent in the SOL, a slow-twitch muscle. Although further experiments are required for better determine the mechanisms involved in the pathophysiology of heart failure, our results contributes to the understanding of the muscle-specific changes that occur in this syndrome.

I - INTRODUÇÃO

1.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido dinâmico e possui características peculiares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos (Pette e Staron, 2000). Esse tecido é constituído por células especializadas, as fibras musculares, que são alongadas e multinucleadas e os núcleos estão localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (Figura 1). As fibras musculares estão imersas em uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo. Esse tecido está organizado em três bainhas distintas: o epimísio, que circunda todo o músculo; o perimísio, que divide o músculo em fascículos e o endomísio, que circunda cada fibra muscular (Craig, 1994; Sanes, 1994). A disposição altamente organizada dos diferentes tipos de fibras musculares confere a este tecido uma ampla diversidade estrutural, metabólica e funcional (Schiaffino e Reggiani, 1994; Pette e Staron, 2000).

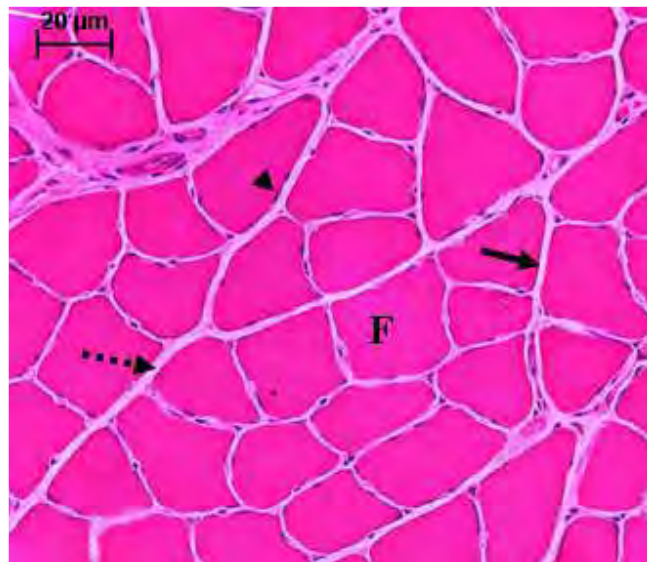


Figura 1 – Corte transversal das fibras do músculo sóleo de ratos. Fibras musculares (F); Perimísio (seta descontinua); Endomísio (seta contínua) e Mionúcleos (ponta da seta). Coloração HE (40x).

A regulação do processo de formação dos músculos esqueléticos envolve a ativação, proliferação e diferenciação de linhagens de células miogênicas e depende da expressão e atividade de vários fatores transcricionais, entre eles, os fatores de regulação miogênica (do inglês, myogenic regulatory factors ou MRFs).

Os MRFs são membros da família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4, (do inglês, myogenic regulatory factors ou MRFs) (Patapoutian et al., 1995; Rawls et al., 1995; Zhang et al., 1995, Yoon et al., 1997).

A Miogenina e a MyoD têm função primária na miogênese e estão envolvidas na manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, rápida ou lenta; a Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (Murre et al., 1989; Hughes et al., 1993; Voytik et al., 1993; Megeney & Rudnicki, 1995). No entanto, estudos têm demonstrado que a Miogenina está mais relacionada com o metabolismo do músculo do que com as mudanças na composição das MHCs (Hughes et al., 1999; Siu et al., 2004).

Morfologicamente as fibras musculares são constituídas por estruturas repetidas, os sarcômeros, unidade contrátil fundamental da fibra muscular (Huxley, 1969). Cada sarcômero é formado por várias proteínas: as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero. O filamento fino é formado pela actina e duas proteínas reguladoras, a troponina e tropomiosina (McComas, 1996). O filamento grosso é formado pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II. A molécula de miosina é um hexâmero formado por duas cadeias pesadas de miosina (do inglês, myosin heavy chain ou MHC), enroladas em α -hélice, e quatro cadeias leves de miosina (do inglês, myosin light chain ou MLC) (Lowey et al., 1969; Weeds & Lowey, 1971; Elliot & Offer, 1978; Warrick & Spudich, 1987). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, conhecida como porção globosa da miosina, a qual apresenta o sítio de ligação com a actina e a região capaz de ligar-se à molécula de ATP e hidrolisá-la (atividade ATPásica) (Huxley, 1969; Lowey et al., 1969) (Figura 2).

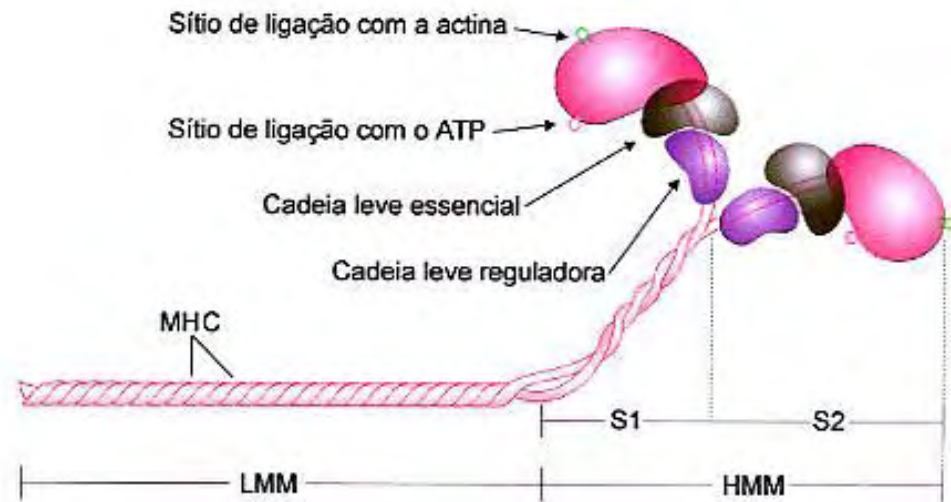


Figura 2 – Esquema da molécula de miosina da classe II. Cadeias pesadas de miosina (MHC), cadeias leves de miosina (MLC), meromiosina leves (LMM), meromiosina pesadas (HMM), e porção globosa S1 e S2 da HMM. (Dal Pai-Silva et al., 2005).

Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (Ranvier, 1873). A cor vermelha está relacionada com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características genéticas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (Dubowitz e Pearse, 1960). Inicialmente as fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (Ogata, 1958). Posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase miofibrilar (mATPase) na porção globular da miosina (mATPase) (Brooke e Kaiser, 1970).

A velocidade de contração de um músculo é diretamente proporcional a atividade da mATPase (Talmadge e Roy, 1993). Este evento foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da miosina de cadeia pesada (MHC) (Barany, 1967; Pette e Staron, 2000). A MHC capaz de rápida hidrólise do ATP é característica das fibras do tipo II, que são fibras de contração rápida. Já a MHC de lenta hidrólise do ATP é encontrada nas fibras do tipo I, de contração lenta (Kelly & Rubinstein, 1994).

Neste contexto, Pette e Staron (2001) classificaram os tipos de fibras musculares em fibras de contração lenta – Tipo I (Slow Fibers), expressando MHCI e fibras de contração rápida – Tipo II (Fast Fibers), subdivididas em tipo IIA, expressando MHCIIa; tipo IID, expressando MHCIIId e tipo IIB, expressando MHCIIb. As fibras do tipo IID (MHCIIId) se equivalem as fibras IIX (MHCIIx), descritas em ratos (Schiaffino e Reggiani, 1994) (Figura 3).

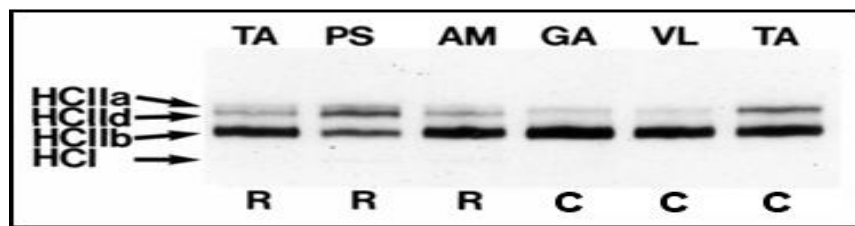


Figura 3- Separação eletroforética das isoformas de miosina de cadeia pesada (MHC) em diferentes músculos de ratos (R) e camundongos (C). Expressão das Isoformas rápidas MHCIIa, MHCIIId e MHCIIb e da Isoforma lenta MHCI. TA, tibial anterior; PS, porção profunda do psoas; AM, adutor magno; GA, gastrocnêmio; VL, vasto lateral; TA, tibial anterior. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE. (adaptado de Hamalainen e Pette, 1993).

As fibras do tipo I, IIA, IID/X e IIB são classificadas como fibras puras (Pette & Staron, 1997; Staron et al., 1999). Porém, além das fibras puras, que expressam apenas um tipo de RNA mensageiro para a MHC, há fibras que co-expressam diferentes genes para a MHC (Biral et al., 1988; Aigner et al, 1993; Schiaffino & Reggiani, 1994; Caiozzo et al., 2003). Essas fibras são classificadas de acordo com o tipo de MHC predominante: Tipo IC (MHC I > MHC IIa), Tipo IIC (MHC IIa > MHC I), Tipo IIAD (MHC IIa > MHC IId), Tipo IIDA (MHCIIId > MHCIIa), Tipo IIDB (MHC IId > MHC IIb) e Tipo IIBD (MHC IIb > MHCIIId) (Di Maso et al.,2000; Pette e Staron, 2000; Pette e Staron, 2001). Deste modo, assume-se uma organização seqüencial das fibras puras, as quais são intermediadas por fibras híbridas (I ↔ IC ↔ IIC ↔ IIA ↔ IIAD ↔ IID ↔ IIDB ↔ IIB) (Pette & Staron, 2000) (Figura 4).

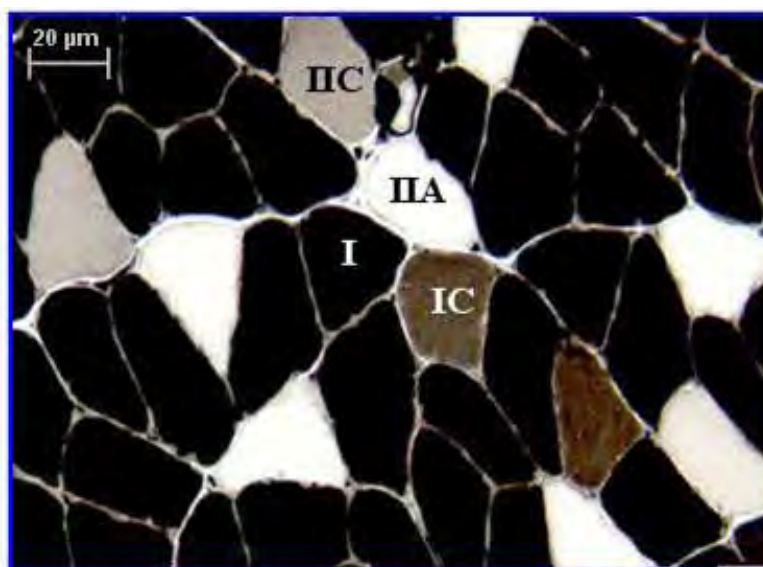


Figura 4– Corte transversal do músculo sóleo de rato. Fibras musculares puras (I e IIA) e híbridas (IC e IIC). Reação da ATPase miofibrilar, pH 4,35.

A natureza dinâmica dos tipos de fibras nos músculos de mamíferos, demonstra que cada tipo de fibra apresenta diferentes atividades das enzimas metabólicas. A análise histoquímica do músculo para as atividades de enzimas mitocondriais e mATPase permite a identificação das fibras como de contração lenta e metabolismo oxidativo; de contração rápida e metabolismo glicolítico e de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico (Peter et al., 1972).

As fibras com metabolismo oxidativo apresentam muitas mitocôndrias, pouco glicogênio e maior número de capilares por fibra. Recebem maior teor de oxigênio e metabólitos, possuem elevada atividade de fosforilação oxidativa e a remoção dos produtos do metabolismo é mais rápida. As fibras com metabolismo glicolítico apresentam poucas mitocôndrias, muito glicogênio e o número de capilares por fibras é menor, sendo o aporte de oxigênio e metabólitos mais reduzido (Silau and Branchero, 1978; Gray et al., 1983; Sanger and Stoiber, 2001).

A identificação das características contráteis das fibras musculares é importante, pois como os músculos são compostos por vários tipos de fibras musculares, suas propriedades refletem a soma das características das fibras que o constituem.

A especificidade na expressão das diferentes isoformas de MHCs, de acordo com o tipo de fibra e músculo analisado, revela uma ampla diversidade estrutural, funcional e metabólica do músculo esquelético (Pette & Staron, 2000).

1.2. Plasticidade Muscular

A diversidade funcional e metabólica dos tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (Campos et al., 2002). Contudo, as fibras musculares exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a alterar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (Pette e Staron, 2000; Magaúda et al., 2004). Esta plasticidade muscular tem sido demonstrada em diferentes estímulos, tais como exercício de resistência (aeróbico), treinamento contra resistência (força), estimulação elétrica, desnervação e reinervação, imobilização, microgravidade, intervenção nutricional, hipoxia, envelhecimento, fatores hormonais (Pette e Staron, 2000; Fluck e Hoppeler, 2003) e frente à algumas patologias. Os estímulos sucessivos podem provocar ajustes específicos no fenótipo das fibras musculares, a fim de suprir as necessidades do organismo, e, adaptar a função muscular (Buller et al., 1960; Gutmann et al., 1972; Simoneau & Pette, 1988; Klitgaard et al., 1990; Frontera et al., 1991; Caiozzo et al., 1992; Caiozzo et al., 1996; Adams et al., 1999; Demirel et al., 1999; Williamson et al., 2000; Fitts et al., 2001; Sharman et al., 2001; Moura et al., 2002; Parcell et al., 2003; Willoughby & Rosene, 2003; Harber et al., 2004; Siu et al., 2004).

Dentre as patologias que podem causar alterações nas características do músculo esquelético destaca-se a Insuficiência Cardíaca (IC) (Poole-Wilson & Ferrari, 1996; Wilson, 1996; Bigard et al., 1998).

1.3. Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é um estado fisiopatológico na qual o coração é incapaz de bombear sangue de acordo com as necessidades metabólicas teciduais, ou pode fazê-lo adequadamente à custa da elevação da pressão de enchimento ventricular (Braunwald et al.,

2001; Givertz et al., 2005). De acordo com Cohn (1988), a IC é uma síndrome clínica associada à disfunção cardíaca, diminuição da expectativa de vida e intolerância aos exercícios físicos.

A IC constitui um importante problema clínico devido à gravidade de suas manifestações e à sua grande prevalência. Estudos de prevalência estimam que aproximadamente 23 milhões de pessoas no mundo têm IC e que dois milhões de casos novos são diagnosticados anualmente (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 1999; Neto, 2004; Barreto et al., 1998). Dados obtidos nos Estados Unidos e na Europa mostram que a incidência média de IC é de 1 a 5 casos por 1000 habitantes/ano, e sua prevalência é de aproximadamente 1% a 2% da população (Cowie et al., 1997). A IC encontra-se entre as principais causas de internação do Sistema Único de Saúde (Albanesi Filho, 1998; Rossi Neto, 2004).

As principais causas da IC são isquemias, inflamações agudas, hipertensão arterial e alterações das valvas cardíacas (Francis, 2001) e entre os principais sintomas da IC encontram-se: dispnéia, fraqueza e fadiga de membros inferiores com conseqüente redução da atividade locomotora, intolerância para realizar exercícios físicos e piora da qualidade de vida (Poole-Wilson & Ferrari, 1996; Wilson, 1996; Bigard et al., 1998). Estudos demonstraram pobre correlação entre débito cardíaco, fluxo sanguíneo e intolerância ao exercício, sugerindo como principais contribuintes para a incapacidade funcional, as alterações periféricas musculares (Wilson, 1995; Vescovo et al., 1998c; Cicoira, 2002; De Sousa et al., 2002).

1.4. Alterações nas fibras do Músculo Esquelético na Insuficiência Cardíaca

Na IC observa-se alterações musculo esqueléticas incluindo aumento do metabolismo glicolítico, decréscimo do metabolismo oxidativo, e menor resistência à fadiga (Simonini et al., 1996; Ventura-Clapier et al., 2003), mudança fenotípica de fibras do Tipo I para do Tipo II, modificações nas miosinas de cadeia pesada e presença de atrofia da musculatura esquelética (Mancini et al., 1992; Harrington et al., 1997; Poehman, 1999; De Sousa, et al., 2000; Carvalho et al., 2003) contribuem para as limitações funcionais (Sullivan et al., 1990; Mancini et al., 1992, Simonini et al., 1996; Bigard et al., 1998; Vescovo et al., 1998a, De Sousa et al., 2000).

Carvalho et al. (2003) demonstraram em ratos com IC induzida por estenose aórtica, que na fase de hipertrofia cardíaca (18 semanas) o músculo SOL já apresenta mudança para um padrão fenotípico mais rápido.

Embora vários fatores tenham sido descritos como responsáveis pelo desenvolvimento de fadiga nos pacientes com IC, sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida. Esse fenômeno é decorrente, em parte, das alterações metabólicas, com aumento do metabolismo glicolítico, decréscimo do metabolismo oxidativo e menor resistência à fadiga (Simonini et al., 1996; Lunde et al., 200; Ventura-Clapier et al., 2003).

Na IC, diferentes vias podem regular as mudanças fenotípicas no músculo esquelético (Allen et al., 2001; Carvalho et al., 2006; Filippatos et al., 2005; Spangenburg et al., 2002), incluindo os MRFs (Hughes et al., 1993; Hughes et al., 1999). Como descrito anteriormente, vários estudos têm sugerido que a MyoD é expressa em níveis superiores em músculos glicolíticos/rápidos, enquanto a miogenina é encontrada principalmente em músculos oxidativos/lentos (Hughes et al., 1993). Estudos têm demonstrado que a miogenina está mais envolvida com o metabolismo do músculo do que com as mudanças nas características contráteis (Hughes et al., 1999, Ekmark et al., 2003, Siu et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que as alterações na expressão dos MRFs estão diretamente envolvidas no controle fenotípico muscular e nas alterações metabólicas, em resposta a várias condições como alterações hormonais, microgravidade e o exercício físico (Mozdziak et al., 1998, Mozdziak et al., Hughes et al., 1999). Entretanto há poucas informações na literatura a respeito do papel dos fatores de regulação miogênica na transição dos tipos de fibras musculares e das isoformas de cadeia pesada de miosina que ocorre nos portadores de IC.

Hughes et al. (1999) demonstraram em animais transgênicos, a atuação da Miogenina na transição do metabolismo de glicolítico para oxidativo, sem alterar as MHCs. Siu et al. (2004) demonstraram no músculo SOL de ratos, submetidos a um programa de exercício aeróbico por 8 semanas, que a Miogenina está linearmente relacionada com adaptações das enzimas do metabolismo oxidativo.

Dados do nosso laboratório evidenciaram a participação dos MRFs na transição fenotípica do músculo diafragma de ratos em modelo de IC induzido por monocrotalina. Houve uma diminuição da expressão de MHC rápidas, associada a uma diminuição da MyoD; sem alterar a expressão da miogenina e do MRF4 (Lopes et al., 2008).

Na IC ocorre aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem com as alterações estruturais, morfológicas e funcionais da musculatura estriada esquelética (Lapu-Bula, 2007; Conraads et al., 2008). O consumo de oxigênio no metabolismo celular resulta na produção

de EROs (Feuers, 1998). Vários fatores podem estar envolvidos neste processo. Primeiramente, uma deficiência de oxigênio ou na demanda de substrato para o músculo, pode levar à hipóxia e reoxigenação resultando na produção de EROs. No entanto, a oferta de oxigênio prejudicada não pode ser a única causa desses transtornos, pois as anormalidades metabólicas são detectados mesmo na presença de fluxo sanguíneo adequado. Por outro lado, vários fatores neuro-humorais, incluindo as catecolaminas, angiotensina II, e citocinas também podem envolvidos na produção de EROs (Drexler, 1992).

Para se proteger das EROs o músculo esquelético contém um sistema de enzimas antioxidantes, dentre as quais encontram-se: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que protegem as células contra a ação das EROs (Powers et al., 1999). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de EROs e os componentes que as neutralizam, em favor do primeiro (Nishiyama et al., 1998). Durante esse processo algumas das EROs podem produzir danos celulares em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

Músculos de metabolismos diferentes apresentam defesa antioxidante distinta (Hollander et al., 1999). Os músculos com predomínio de fibras oxidativas/lentas possuem maior atividade das enzimas antioxidantes, devido ao maior consumo de oxigênio (Semba et al., 2007). Já, nos músculos com predomínio de fibras musculares Tipo IIA e IIB, a atividade destas enzimas é menor (Ji et al., 1992; Hollander et al., 1999).

Recentemente, o papel do estresse oxidativo no músculo esquelético tem sido explorado como mecanismo de progressão da insuficiência cardíaca (Dalla Libera et al., 2005; Kinugawa et al., 2000; Tsutsui et al., 2001; Tsutsui et al., 2008; Vescovo et al., 2008) e tem sido relacionada à intolerância ao exercício em pacientes com IC (Nishiyama et al., 1998).

Em humanos com IC, alterações no metabolismo oxidativo no músculo Vasto Lateral foram observadas, estando associadas à redução da capacidade e menor tolerância ao esforço (menor VO_2 máx). Os autores sugerem a relação dessas alterações com aumento do estresse oxidativo (Vescovo et al., 2008).

Tsutsui et al. (2001) demonstraram no músculo SOL e gastrocnêmio de ratos com IC induzida por infarto do miocárdio, diminuição da atividade mitocondrial e aumentou a produção de EROs. No entanto, a atividade das enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase, não alterou entre os grupos.

De acordo com Dalla Libera et al. (2005), no modelo de insuficiência cardíaca induzida por monocrotalina em ratos, a diminuição da função muscular e capacidade física foram devido à oxidação das proteínas actina miosina e tropomiosina. Durante a IC, o dano oxidativo pode ocorrer na isoforma de MHC e isso pode contribuir, em parte, à disfunção muscular esquelética, que ocorre nesta síndrome (Coirault et al., 2007).

Atualmente pouco é conhecido sobre as alterações promovidas pelo estresse oxidativo nas características morfofuncionais em músculos com padrões contráteis e metabólicos distintos na IC.

II- OBJETIVO

A hipótese desse trabalho é que na insuficiência cardíaca, o estresse oxidativo pode causar alterações morfofuncionais distintas em músculos oxidativos e glicolíticos

O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar as características morfofuncionais dos músculos Sóleo (SOL) (com predomínio lento e oxidativo) e Extensor Digitorum Longus (EDL) (com predomínio rápido e glicolítico) na IC induzida por monocrotalina em ratos.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Protocolo Experimental

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IB), UNESP. Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal de 90 a 100g, provenientes do Centro do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Dois grupos experimentais foram utilizados:

- Grupo controle (CT)
- Grupo insuficiência cardíaca (IC)

Foram realizados dois experimentos idênticos devido à grande quantidade de análises que foram realizadas. Foram utilizados 23 animais (10 CT e 13 IC) em cada experimento.

A IC foi induzida pela injeção de monocrotalina (MCT – SIGMA, C-2401), um alcalóide extraído da leguminosa *Crotalaria spectabilis*, que induz às lesões nos vasos pulmonares, com severa hipertensão arterial pulmonar, seguida de HVD e IC, sem acarretar, per si, alterações na musculatura esquelética (Reindel et al., 1990; Vescovo et al., 1998).

A monocrotalina foi injetada intraperitonealmente numa única dose (30 mg/kg i.p.). Esses animais receberam ração e água *ad libitum*. No grupo CT, foi injetada solução salina e esses receberam a mesma quantidade de ração consumida, no dia anterior, pelo grupo IC. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de 23 °C e com ciclos de luminosidade de 12 horas, no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia – IB – UNESP – Botucatu.

Os animais foram observados diariamente para a detecção dos sinais compatíveis com o diagnóstico clínico de IC, como taquipnéia e pelos arrepiados. A presença de IC foi confirmada, no sacrifício dos ratos, pela presença de derrame pleural, ascite, trombo em átrio direito e hipertrofia do ventrículo direito (Dalla Libera et al., 1999; Carvalho et al., 2003).

Sacrifício dos animais

Quando os sinais de insuficiência cardíaca foram visualizados, o que ocorre, neste modelo, após 22 dias da injeção de monocrotalina, os animais foram pesados e posteriormente sacrificados por decapitação.

Estudo dos parâmetros anatômicos

Os músculos SOL e EDL dos membros inferiores direito e esquerdo foram dissecados e pesados. As razões SOL/PC, EDL/PC foram utilizadas como índice de atrofia muscular (Vescovo et al., 1998). O ventrículo esquerdo (VE) e direito (VD) também foram dissecados e pesados separadamente. As relações entre o peso dos ventrículos esquerdo (PVE) e direito (PVD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (PVE/PC e PVD/PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia ventricular.

Análise morfológica e histoquímica

Após a retirada e pesagem dos músculos SOL e EDL, fragmentos do terço medial direito foram congelados, utilizando-se isopentano a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, previamente resfriado em nitrogênio líquido. O material congelado foi armazenado em Freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise. Cortes histológicos com $10\text{ }\mu\text{m}$ foram obtidos em micrótomo criostato e submetidos à coloração HE para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares; outros cortes foram submetidos à reação histoquímica de ATPase miofibrilar (Brooke e Kaiser, 1970) para a identificação dos tipos de fibras e análise de área.

Análise da Cadeia Pesada das Miosinas (MHC)

A análise da cadeia pesada das miosinas (MHC) foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram utilizados 12 cortes transversais ($12\text{ }\mu\text{m}$ de espessura) de músculo, colocados em 0,5mL de uma solução contendo glicerol 10 % (w/vol), 2-mercaptoetanol 5 % (vol/vol), SDS 2.3 % (w/vol), Tris HCl 0.9 %

(w/vol) por 10 minutos, a 60 °C. Procedeu-se a eletroforese de pequenas quantidades dos extratos (5-8 µl), em gel de poliacrilamida (gradiente de 7-10 %) com um gel de empacotamento a 4 %, com 26 horas de corrida a 180 V, e em seguida, corado com Coomassie Blue. As isoformas das cadeias pesadas das miosinas foram identificadas de acordo com seus pesos moleculares, os géis fotografados, as imagens capturadas por VDS Software (Pharmacia Biotech) e a porcentagem relativa quantificada por densitometria usando Image Master VDS Software (*version 3.0*).

Análise Bioquímica

Fragmentos dos músculos SOL e EDL pesando aproximadamente 200 mg foram homogeneizados em 5 ml de fosfato de sódio tampão a 0,1 M, pH de 7,4, contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O tecido homogeneizado foi preparado em um homogeneizador Teflon Glass Potter Elvehjem por 1 minuto a 100 rpm., sendo centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi usado para determinar a concentração das proteínas totais. Também foi determinada a concentração hidroperóxido de lipídio (HL), a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD).

O hidroperóxido de lipídio foi determinado através da oxidação do Fe²⁺ (sulfato ferroso amoniacal) em condições ácidas (Jiang et al., 1991). As atividades enzimáticas foram determinadas com a utilização de leitor de microplacas (Bio-Tech Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), e as determinações espectrofotométricas feitas com espectrofotômetro Pharmacia Biotech (974213, Cambridge, Inglaterra).

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada por meio da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio (Hopkins and Tudhope, 1973); a atividade da superóxido dismutase foi determinada, tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (Ewing and Janero, 1995).

Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).

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

No momento da extração de RNA, fragmentos musculares, previamente congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 ml de TRIzol/50-100 mg de tecido. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 ml e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 ml de clorofórmio, por ml de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado novamente, por três minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5 ml de isopropanol (por ml de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1 ml de etanol 75 % (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por cinco minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em 30 µl água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma[®] - DEPC, a 0,01 %), incubado por 10 minutos à temperatura de 60 °C e, finalmente, armazenado a – 80 °C. O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA. Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas), o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração. Serão utilizadas as amostras com razão ≥ 1.8 .

b) Gel analítico de agarose para RNA

A qualidade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 2 µg de RNA em gel de agarose a 1 %, não denaturante, corado com SYBR Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)

c) Tratamento do RNA com DNase

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), o RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde foi acrescentado 1 µl de tampão DNase, 1 µl de DNase I (1 unidade/ml) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µl de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescido de 1 µl de EDTA (25mM) e incubado a 65 °C por 10 minutos.

d) Reação de Transcrição Reversa (RT)

A transcrição reversa do RNA total obtido do músculo esquelético foi realizada em alíquotas contendo 1 µg de RNA total ao qual foi adicionado 1 µl de Randon Primers (50 ng/µl), 1 µl de dNTP (10 mM) e o volume ajustado para 10 µl com H₂O com DEPC (dietil pirocarbonato). Cada amostra foi incubada a 65 °C por 5 minutos e, incubada no gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 9 µl de uma mistura composta de 2 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M e 1 µl de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT e, a mistura incubada a 25 °C por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado em cada tubo 1 µl de enzima de transcriptase reversa (50 unidades) e, a mistura incubada a 42 °C durante uma hora, seguida de um período de 15 minutos a 75 °C. Foi adicionado, em cada tubo, 1 µl da enzima RNase H e incubado por 20 minutos a 37 °C.

e) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR)

Alíquotas de 5 µl da reação de RT foram adicionadas a uma mistura contendo, 25 µl de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG, 1µl de primers “sense” e “anti-sense” (10 µM) e o volume completado para 50 µl com água tratada com DEPC, para cada amostra. Os primers para os genes analisados (Tabela 1) foram obtidos através do programa para desenho de primers OligoPerfect[™] Designer disponível no endereço eletrônico (www.invitrogen.com/oligos), a partir

de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), para garantir a especificidade das seqüências-alvo, evitar a formação de estruturas secundárias dos primers e a dimerização dentro de cada primer e entre os primers sense e anti-sense. Os fragmentos dos produtos de qPCR formam 80-250 pares de bases, confirmados por gel de agarose 1 % em tampão TAE (1x) corado com SYBR safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Obtivemos concentração ótima dos primers (100 a 500 nM) comprovada pela análise da curva de anelamento para identificação da formação de dímeros dos primers e pela especificidade da reação. As condições dos ciclos da reação do qPCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento adquirido. Foram analisados por meio do software Genorm quatro genes constitutivos: ARBP (Acidic ribosomal phosphoprotein), HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), TBP (Tata Box Binding protein) e GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) dos quais os mais estáveis foram utilizados como genes de referência. Para o modelo e músculos estudados os genes constitutivos mais estáveis foram HPRT e ARBP. O fator de normalização gerado pelo software foi utilizado para normalizar os dados de expressão dos genes alvo.

Tabela 1: Genes analisados pela reação de qRT-PCR.

Genes	Nº de acesso	Seqüência (5' – 3')
MyoD	NM_176079.1	TTTTTCATGCGACTCACAGC GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
Myogenin	M24393.1	T GCCACAAGCCAGACTACCCACC CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA
ARBP	NM_022402	CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG
HPRT	NM_012583	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC

Nº de acesso: número de acesso às seqüências publicadas no GenBank.

Estudo Funcional

a) Preparação músculo extensor longo dos dedos e músculo sóleo de camundongo

Os músculos SOL e EDL foram rapidamente removidos e umedecidos intermitentemente com solução nutriente *Ringer* com a seguinte composição (mM): NaCl (135); KCl (5); MgCl₂ (2); NaHCO₃ (15); CaCl₂ (2); Na₂HPO₄ (1) e glicose (11). Em seguida os músculos foram montados verticalmente em cubas para órgão isolado, contendo 25 ml de solução nutriente, constantemente borbulhada com carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂) segundo Gallacci e Oliveira (1994). Os tendões dos músculos SOL ou EDL foram conectados a um suporte de vidro em forma de L e a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03), acoplado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50). Os registros foram efetuados em um computador, por meio de um sistema de aquisição de dados (Gould Systems, Summit ACQUIRE e Summit DataViewer). A seguir, cada músculo foi posicionado entre os polos de um eletrodo bipolar de platina, e este foi acoplado a um estimulador elétrico (Grass, S88). Para evitar alguma contribuição da contração indireta, pancurônio (2×10^{-6} M), um clássico bloqueador de receptores nicotínicos pós-sinápticos, foi adicionado à solução nutriente.

b) Protocolo Experimental do Estudo Funcional

Em todos os experimentos, as preparações foram mantidas a 27 ± 2 °C e submetidas a um período de estabilização de 10 minutos (duração de 4 ms, frequência de 0,2 Hz e 30 V). No final deste período, a tensão de base foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima para cada preparação. Em seguida, foram realizados estímulos tetânicos de 2 segundos de duração e com intervalos de 3 minutos (músculos SOL e EDL nas frequências de 120 Hz e 200 Hz, respectivamente), para estabelecer a voltagem ideal para cada preparação. A seguir, foram registrados 45 minutos de contrações controle.

c) Resistência à Fadiga e Propriedades Contráteis

O teste de resistência à fadiga foi realizado por meio de 30 contrações tetânicas. Para o músculo EDL foi utilizada frequência de 200 Hz, e para o músculo SOL 120 Hz. A duração do tétano foi 0.9 s para o músculo EDL e 1.5 s para o músculo SOL. Essas combinações de frequência e duração do tétano resultam no mesmo número de estímulos em cada tétano para os

dois músculos (Barclay, 1992). A resistência à fadiga foi determinada por meio da razão (%) da amplitude da contração tetânica final em relação à inicial.

As propriedades contráteis, observadas na primeira contração do experimento de fadiga, foram: força máxima de contração, tempo de contração e tempo de relaxamento das contrações tetânicas. O tempo de contração foi determinado entre 10 % e 90 % do desenvolvimento da força máxima de contração e o tempo de relaxamento entre 90 % e 10 % após o pico de contração máxima. Após as gravações, os músculos foram secos e pesados. A força máxima de contração foi normalizada pela área de secção transversa do músculo.

Análise estatística

Para a análise do peso corporal, do peso dos músculos SOL e EDL, do índice de atrofia muscular (SOL/PC e EDL/PC), dos dados bioquímicos e valores das propriedades contráteis foi utilizado o teste t de Student. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

Para a análise do peso das câmaras cardíacas (AT, VE e VD), do índice de hipertrofia cardíaca (AT/PC, VE/PC e VD/PC), da frequência dos tipos de fibras, análise funcional de resistência à Fadiga e da expressão gênica foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (Zar, 1999). Os valores foram expressos em mediana, valor máximo e valor mínimo. Uma diferença de 5 % foi considerada estatisticamente significativa.

IV- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GR, McCue SA, Zeng M, Baldwin KM (1999) Time course of myosin heavy chain transitions in neonatal rats: importance of innervation and thyroid state. *Am J Physiol* 276:R954–R961.

Aigner S, Gohlsch B, Hämäläinen N, Staron RS, Uber A, Wehrle U, Pette D (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles the rabbit: heavy chain II_d, not II_b predominates. *Eur J Biochem* 211:367-372.

Albanesi Filho FM (1998) Insuficiência cardíaca no Brasil. *Arq Bras Cardiol* 71:561-562.

Allen DL, Sartorius CA, Sycuro LK, Leinwands LA. (2001) Different pathway regulate of the skeletal myosin heavy chain. *J Biol Chem* 274: 43524-43533.

Barany M (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197-218.

Barclay CJ (1992) Effects of fatigue on rate of isometric force development in mouse fast- and slow- twitch muscle *Am J Physiol* 263 (Cell Physiol. 32): C1065-C1072.

Barretto ACP, Nobre MCR, Wajngarten M, Canesin MF, Ballas D, Serro-Azul JB. (1998) Insuficiência cardíaca em grande hospital terciário de São Paulo. *Arq Bras Cardiol* 71 (1):15-20.

Bigard X, Boehm E, Veksler V, Mateo P, Anflous K, Ventura-Clapier R (1998) Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30:2391-2401.

Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J* 250:307-308.

Braunwald E, Zipes DP, Libby P (2001) *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine* (6th ed). W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18:670-672.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM (1960) Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J Physiol (Lond)* 150:417–439.

Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM (1992) Response of slow and fast muscle to hypothyroidism - maximal shortening velocity and myosin isoforms. *Am J Physiol* 263:C86–C94.

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM (1996) Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle *J Appl Physiol* 81:123-132.

Caiozzo VJ, Baker MJ, Huang K, Chou H, Wu YZ, Baldwin KM (2003) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R570-580.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50–60.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, De Assis JM, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-Silva MD. (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol.* 84(4):201-6.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, Lopes FS, Sugizaki MM, Nogueira CR, Pai-Silva MD. (2006) Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 87:219-225.

Cicoira M (2002) Muscle changes and exercise intolerance in congestive heart failure: main role of the periphery. *Ital Heart J Suppl* 3(9):908-912.

Cohn JN (1988) Current therapy of the failing heart. *Circulation.* 78 (5 Pt 1):1099-107.

Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecar-pentier Y (2007) Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1009–H1017.

Conraads VM, Hoymans VY, Vrints CJ (2008) Heart failure and cachexia: insights offered from molecular biology *Front Biosci* 13:325-335.

Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE (1997) The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 18:208-225.

Craig R (1994) The structure of the contractile filaments. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*. New York: McGraw-Hill :134-175.

Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Carvalho RF (2005) Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole, São Paulo: 83-94

Dalla Libera L, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB, Vescovo G (1999) Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscle in chronic heart failure. *Am J Physiol* 277:C982-C986.

Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Betto DD, Germinario E, Angelini A, Vescovo G. (2005) Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective of Carvedilol. *J. Molecular and Cellular Cardiology* 38:803-807.

- De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R (2000) Heart failure affects mitochondrial but not intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation* 102:1847-1853.
- De Sousa E, Lechenê P, Fortin D, Guessan BN, Belmadani S, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R (2002) Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovascular Research* 56: 260-268.
- Demirel HA, Powers SK, Naito H, Hughes M, Coombes JS (1999) Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship *Am Physiol Soc* 86:1002-1008.
- Di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM (2000) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hyperthyroidism. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol* 278:1099-1106.
- Drexler H (1992) Skeletal muscle failure in heart failure. *Circulation*. 85:1621–1623.
- Dubowitz V, Pearse AG (1960) A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochem cell biol* 2:105-117.
- Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, Gundersen K (2003) Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol* 548 (Pt1):259-269.
- Elliott A, Offer G (1978) Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol* 123(4):505-519.
- Ewing JF, Janero DR (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Annals of Biochemistry* 232: 243-248.
- Feuers RJ, (1998) The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 125: 192–201.
- Filippatos GS, Anker SD, Kremastinos DT (2005) Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(3):249-254.
- Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ (2001) Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity *The Journal of Experimental Biology* 204: 3201-3208.
- Fluck M & Hoppeler H (2003) Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:160-161.
- Francis GS (2001) Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 110:37S-46S.
- Frontera WR, Hughes VR, Lutz KJ, Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45- to 75-yr-old men and women *J Appl Physiol* 71: 644–650.

Gallacci M, Oliveira AC, (1994) Pre- and postsynaptic mechanisms involved in tetanic fade induced by pancuronium in the isolated rat muscle. *Pharmacology* 49, 265–270.

Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E (2005) Clinical Aspects Of Heart Failure; Pulmonary Edema, High-Output Failure. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E (Eds). *Braunwald's heart disease: a text book of cardiovascular medicine* (7th ed.) Elsevier Saunders, Philadelphia: 539-568.

Gray SD, McDonagh PF, Gore RW (1983) Comparison of functional and total capillary densities in fast and slow muscles of the chicken. *Pflugers Arch* 397: 209-13.

Gutmann E, Melichna J, Syrový I (1972) Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp Neurol* 36:488–497.

Hamalainen N, Pette D (1993) The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, ID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat, and Rabbit. *J Histochem Cytochem* 41(5):733-743.

Harber MP, Fry AC, Rubin MR, Smith JC, Weiss LW (2004) Skeletal muscle and hormonal adaptations to circuit weight training in untrained men. *Scand J Med Sci Sports* 14:176–185.

Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ. (1997) Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 30(7):1758-64.

Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, et al. (1999) Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol* 277: R856–862.

Hopkins J, Tudhope GR (1973) Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology* 25:563-575.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and Miogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118:1137-1147.

Hughes SM, Chi MM, Lowry OH, Gundersen K (1999) Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol* 145: 633-642.

Huxley HE (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164(886):1356-1365.

Ji LL, Fu R, Mitchell EW (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73:1854–1859.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26: 853-856.

- Kelly AM, Rubinstein NA (1994) The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology* (2nd ed). McGraw-Hill, London :119-133.
- Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A (2000) Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87:392–398.
- Klitgaard H, Mantoni M, Schiaffino S, Ausoni S, Gorza L, Laurent-Winter C, Schnohr P, Saltin, B (1990) Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men male with different training backgrounds. *Acta Physiol. Scand.* 140: 41–54.
- Lapu-Bula, Ofili E (2007) From hypertension to heart failure: role of nitric oxide-mediated endothelial dysfunction and emerging insights from myocardial contrast echocardiography. *Am J Cardiol* 26:7–14.
- Lopes FS, Carvalho RF, Campos GER, Sugizaki MM, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC, Dal Pai-Silva M (2008) Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Pathol*, 89:216–222.
- Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H (1969) Substructure of the myosin molecule.I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42(1):1-29.
- Lunde PK, Sjaastad I, Schiøtz THM (2001) Skeletal muscle disorders in heart failure. *Acta Physiol Scand* 171:227-294
- Magaudda L, Mauro DD, Trimarchi F, Anastasi G (2004) Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. *Basic Appl Myol* 14(1):17-21.
- Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR (1992) Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure *Circulation* 85:1364-1373.
- McComas AJ (1996) *Skeletal Muscle: Form and Function*. Champaign, III: Human Kinetics.
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73(9-10):723-732.
- Moura IMW, Dos Santos FF, Moura JAA, Curi R, Fernandes LC (2002) Creatine supplementation induces alteration in cross-sectional area in skeletal muscle fibers of wistar rats after swimming training. *J Sports Sci and Med* (1):87-95.
- Mozdziak PE, Geaser ML, Schultz E (1998) Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J Apply Physiol* 84: 1359-1364.

Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.

Neto JMR. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do Mundo. *Rev SOCESP*. 2004; 14 (1): 1-7.

Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T (1998) Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 135:115–120.

Ogata TA (1958) Histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. *Acta Med Okayama* 12:233-240.

Parcell AC, Sawyer RD, Poole RC (2003) Single muscle fiber myosin heavy chain distribution in elite female track athletes. *Med Sci Sports Exerc* 35(3):434-438.

Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B (1995). Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development* 121(10):3347-3358.

Peter JB, Barnard VR, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscles in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11:2627-2633.

Pette D, Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170:143-223.

Pette D, Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 50:500-509.

Pette D & Staron RS (2001) Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem cell biol* 115:359-372.

Poehlman ET (1999) Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. *J Nutr.* v.129 p(1S Suppl): 260S-263S.

Poole-Wilson PA, Ferrari R. (1996) Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28:2275-2285.

Powers SK, Hamilton K (1999) Antioxidants and exercise. *Clin Sports Med* 18(3):525-36.

Ranvier L (1873) Properties et structures differents des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *CR Hebd Seances Acad Sci* 7:2062-2072.

- Rawls A, Morris JH, Rudnicki M, Braun T, Arnold HH, Klein WH, Olson EN (1995) Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 172(1):37-50
- Reindel JF, Ganey JG, Wagner Rf, Slocombe RF, Roth AR (1990) Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lung of rats given monocrotaline pirrole. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 106:179-200.
- Rossi Neto JM (2004) A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 14:1-9.
- Sanes JR (1994) The extracelular matriz. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*. New York: McGraw-Hill :242-243.
- Sanger AM, Stoiber W (2000) Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston IA. *Muscle Development and Growth. Fish Physiology Series*. San Diego: Academic Press; 2001. :187- 250.
- Schiaffino S & Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77(2):493–501.
- Semba RD, Lauretani F, Ferrucci L (2007) Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458:141-145.
- Sharman MJ, Newton RU, Triplett-McBride T, McGuigan MRM, McBride JM, Hakkinen A, Hakkinen K, Kraemer WJ (2001) Changes in myosin heavy chain composition with heavy resistance training in 60-to 75-year old men and women. *Eur J Appl Physiol* 84:127-132.
- Silau AH, Branchero, N (1978) Skeletal muscle fiber size and capillarity. *Proc Soc Exp Biol Med* 158: 288-91.
- Simoneau J-A & Pette D (1988) Species-specific effects of chronic nerve stimulation upon tibialis anterior muscle in mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 412:86–92.
- Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M, Samarel AM (1996) Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28:1683-1691.
- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE (2004) Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 97:277-285.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. (1999) II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 72 (supl 1): 4-30.
- Spangenburg EE, Chakravarthy MV, Booth FW (2002) p27Kip1: a key regulator of skeletal muscle satellite cell proliferation. *Clin Orthop* (403):S221-S227.

- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111:117-123.
- Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR (1990) Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 81:518-527.
- Talmadge RJ & Roy RR (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 75(5): 2337-2340.
- Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, Nakamura K, Ichikawa K, Utsumi H, Takeshita A (2001) Enhanced Generation of Reactive Oxygen Species in the Limb Skeletal Muscles From a Murine Infarct Model of Heart Failure *Circulation* 104:134-136.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2008) Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure *Suppl A: A31-A37*.
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2003) Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555:1-13.
- Vescovo G, Serafini F, Dalla Libera L, Leprotti C, Facchin L, Tenderini P, Ambrosio B (1998) Skeletal muscle myosin heavy chain in heart failure: correlation between magnitude of isozyme shift, exercise capacity, and gas exchange measurements. *Am Heart J* 135(1):130-137.
- Vescovo G, Ravara B, Libera LD (2008) Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure. *Basic Res Cardiol*, 103(3): 285-290.
- Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. *Dev Dynam* 198: 214-224.
- Warrick HM, Spudich JA (1987) Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* 3:379-421
- Weeds AG & Lowey S (1971) Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 3:379-421.
- Williamson DL, Godard MP, Porter DA, Costill DL, Trappe, SW (2000) Progressive resistance training reduces myosin heavy chain co-expression in single muscle fibers from older men. *J Appl. Physiol* 88: 627-633.
- Willoughby DS & Rosene JM (2003) Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Med Sci Sports Exerc* 35(6):923-929.
- Wilson JR (1995) Exercise intolerance in heart failure. *Circulation* 91:559-561.

Wilson JR (1996) Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28:2287–2292.

Yoon JK, Olson EN, Arnold HH, Wold BJ (1997) Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus. *Dev Biol* 188(2):349-62.

Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.

Zhang W, Behringer RR, Olson EN (1995) Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* 9(11):1388-1399.

V- CAPÍTULO I – Artigo

Differential morphofunctional characteristics in fast and slow muscles in a monocrotaline-induced heart failure.

Abstract

Heart failure (HF) is characterized by a limited exercise tolerance, skeletal muscle myopathy with atrophy, shift toward fast muscle fiber and myogenic regulatory factors (MRFs) changes. Reactive oxygen species (ROS) also contribute to target organ damage in the heart failure syndrome. In this study, we investigated and compared the morphofunctional characteristics in SOL, a slow oxidative muscle and EDL, a fast glycolytic muscle in a monocrotaline-induced heart failure. Two groups of rats were studied: control (CT) and Heart Failure (HF), induced by a single intraperitoneal injection of monocrotaline (MCT, 30mg/Kg). MyoD and myogenin expression were determined by using qRT-PCR, MHC isoforms were determined by using polyacrylamide gel electrophoresis, muscle fiber-type frequency and cross sectional area (CSA) were analyzed by myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase). Were performed biochemical study to determine: lipid hydroperoxide (LH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD); myographic study was performed to determine: amplitude, rise time, fall time and fatigue resistance in SOL and EDL muscles. All monocrotaline treated rat showed signs of HF (atrium and right ventricular hypertrophies, pleural and pericardial effusions, and congested liver), SOL and EDL muscles atrophy, confirmed by CSA decreased in muscle fiber types (types I, IC, IIC and IIA in SOL and I, IIC, IIA, IIA/D and IIDB in EDL muscles). Muscle fiber frequency decreased in IIC type and the fall time of muscle contraction increased only in SOL muscle. The mRNA expression of myogenin was lower in SOL muscle and mRNA expression of MyoD was decreased in EDL muscle. The concentration of lipid hydroperoxide was increased, and superoxide-dismutase and glutathione peroxidase activity reduced only in SOL muscle of animals with heart failure. The percentage distribution of MHCs, contractile properties, concentration of HL and antioxidant enzyme activity were not different in EDL muscle. In conclusion, our results indicate that the HF induced by monocrotaline promoted biochemical, morphological and functional changes, more prominent in the SOL, a slow-twitch

muscle. Although further experiments are required for better determine the mechanisms involved in the pathophysiology of Heart Failure, our results contributes to the understanding of the muscle-specific changes that occur in this syndrome.

Keywords: Skeletal muscle, Heart failure, Oxidative stress, Myosin, MRFs, Monocrotaline

Introduction

Heart failure (HF) is a clinical syndrome characterized by a limited exercise tolerance with early appearance of dyspnea and fatigue (Coats et al. 1994) and by high mortality. It has been shown that the increased levels of circulating inflammatory cytokines together with neuroendocrine activation and catabolic/anabolic imbalance produces a skeletal muscle myopathy, characterized by muscle wastage, reduced oxidative capacity, a shift from slow fatigue resistant type I to fast less fatigue resistant type II fibers and atrophy (Dalla Libera et al. 2004; De Sousa et al. 2000; Lipkin et al. 1988; Mancini et al. 1992; Vescovo et al. 1998). These changes further depress exercise capacity.

In HF, different pathways regulate phenotypic changes in skeletal muscle (Allen et al. 2001; Carvalho et al. 2006; Filippatos et al. 2005; Spangenburg et al. 2002), including the myogenic regulatory factors (MRFs), a family of transcriptional factors that control the expression of several skeletal muscle specific genes (Hughes et al. 1993; Hughes et al. 1999). The family has four members: MyoD, myogenin, Myf5, and MRF4. MRFs form dimers with ubiquitous E proteins (e.g. E12 or E47) resulting in heterodimeric complexes that bind to the E-box consensus DNA sequence (5'-CANNTG-3') found in the regulatory region of many muscle-specific genes (Murre et al. 1989). During embryogenesis, MRFs are critical for establishing myogenic lineage and controlling terminal differentiation of myoblasts (Parker et al. 2003). Several studies have suggested that MyoD transcript is prevalent in fast glycolytic muscle, whereas the myogenin transcript is mainly found in slow-oxidative muscle (Hughes et al. 1993). Studies have shown that myogenin is more involved with oxidative gene expression and metabolic enzyme activity than contractile characteristics (Ekmark et al. 2003; Hughes et al. 1999; Siu et al. 2004).

Reactive oxygen species (ROS) also contribute to target organ damage in the heart failure syndrome (Lapu-Bula 2007). The use of oxygen to oxidative metabolism result in ROS production (Feuers 1998). Several possible factors might be involved in this process. First, an impaired oxygen or substrate delivery to the muscle could lead to hypoxia and reoxygenation resulting in the generation of ROS. However, impaired oxygen delivery cannot be the sole cause of these derangements because the metabolic abnormalities are detected even in the presence of adequate blood flow. Second, various neurohumoral factors including catecholamines, angiotensin II, and cytokines also can activate the generation of ROS (Drexler 1992).

Nevertheless, skeletal muscle contains an enzymatic antioxidative system encompassing superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (Cat), which protect the cells from attacks by ROS (Powers et al. 1999). Oxidative stress is an imbalance between the oxidants and antioxidants systems in favor of the former (Nishiyama et al.1998). Recently, the role of oxidative stress in skeletal muscle has been explored as such a mechanism of HF progression (Dalla Libera et al. 2005; Kinugawa et al. 2000; Tsutsui et al. 2001; Tsutsui et al. 2008; Vescovo et al. 2008) and has been related to exercise intolerance in patients with HF (Nishiyama et al. 1998).

Tsutsui et al. (2001) showed in the soleus and gastrocnemius muscles in rats with heart failure induced by myocardial infarction, mitochondrial activity decreased and increased ROS production. However, antioxidant enzyme activities, including superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, were similar between groups.

According to Dalla Libera et al. (2005), in the model of heart failure induced by monocrotaline in rats, the decrease in muscle function and exercise capacity were due to the oxidation of the proteins actin, myosin and tropomyosin. During HF, oxidative damage can occur in the myosin heavy chain isoform and this may contribute, in part, to skeletal muscle dysfunction that occurs in this syndrome (Coirault et al. 2007). These results support the hypothesis that oxidative stress may cause (at least in part) skeletal muscle dysfunction in heart failure.

However, little is known about the oxidative stress damage on the morphofunctional characteristics in the oxidative and glycolytic muscles during HF. In this study, we investigated

and compared the morphofunctional characteristics in SOL, a slow oxidative muscle and EDL, a fast glycolytic muscle in a monocrotaline-induced heart failure.

Materials and methods

Experimental model

Twenty weaned male Wistar rats (3–4 weeks old; 80 - 100 g) were obtained from the Central Animal House at São Paulo State University. Heart failure (HF) was experimentally induced in ten rats (HF group) by a single intraperitoneal (i.p., 30 mg/kg) injection of monocrotaline (MCT – SIGMA, C-2401), a widely accepted heart failure model (Dalla Libera et al. 2001; Leineweber et al. 2002; van Albada et al. 2010; Vescovo et al. 1998). MCT is a pyrrolizidine alkaloid that induces pulmonary vascular disease with severe right ventricle hypertrophy and failure (Reindel et al. 1990; Vescovo et al. 1989) without itself producing changes in skeletal muscle (Vescovo et al. 1998). Preliminary experiments conducted in our lab revealed that 30 mg/kg i.p. was an appropriate dose of MCT for the animals with regard to survival and HF induction (Carvalho et al. 2006; Carvalho et al. 2010). MCT-treated rats were allowed to eat freely from a supply of standard rat cubes. Ten control rats (CT group) were injected with saline and were given the same quantity of food as consumed on the previous day by the treated rats. HF and CT rats were studied 22 days after monocrotaline administration when the HF group had developed overt heart failure. At the end of the experimental period, the animals were sacrificed by decapitation and body weight (BW), SOL and EDL muscle weight were evaluated. The EDL/BW and SOL/BW ratio were used as index of muscle atrophy. Left ventricle weight (LVW), right ventricle weight (RVW), and atrium weight (ATW) normalized by body weight (LVW/BW, RVW/BW and ATW/BW, respectively) were used as indexes of heart hypertrophy. This experiment was approved by the Ethics Committee of Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol. Number 103/2009-CEEA).

Histochemical and morphometric procedures

SOL and EDL muscle were removed and the middle portion frozen in liquid nitrogen at -156 °C. Samples were kept at -80 °C until use. Histological sections (12 µm thick) were obtained in a cryostat (JUNG CM1800, Leica Germany) at -24 °C to determine muscle fiber-type frequency and cross sectional area (CSA), using myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemistry after preincubation at pH 4.2 and 4.5 (Brooke and Kaiser 1970; Guth and Samaha 1969) muscle fiber types were classified as types I, IC, IIC, and IIA in SOL and I, IIC, IIA, IIAD and IID/B in EDL muscles (Staron et al. 1999) (Fig. 1). Fiber cross-sectional area for each fiber type and fiber-type frequency was determined using Image Analysis System Software (Leica, Germany). These parameters were calculated in two random fields per animal using a 20x objective.

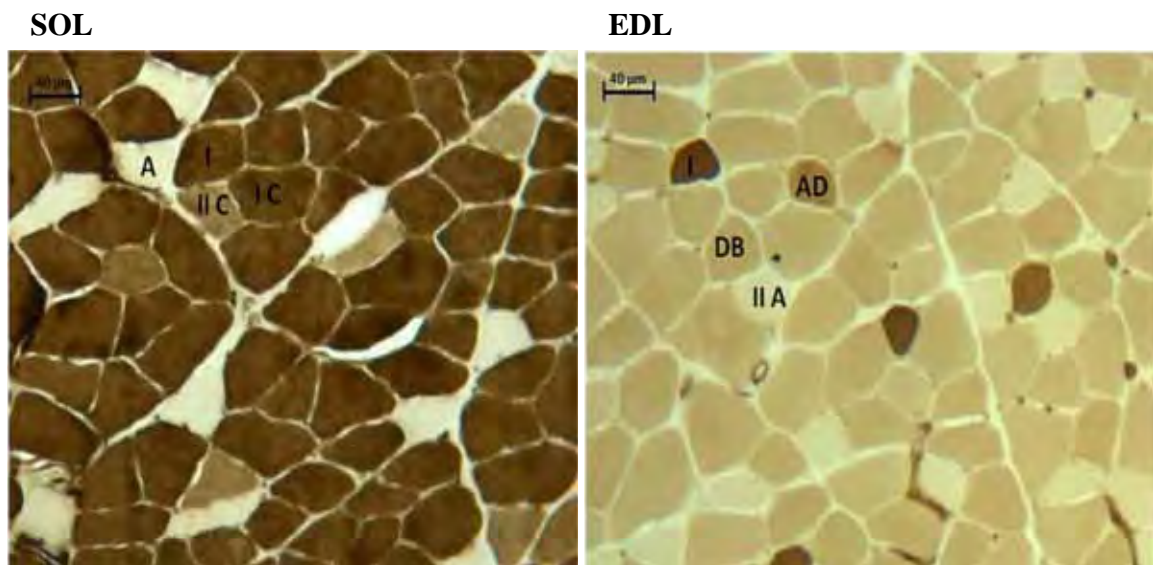


Fig. 1. Cross sections of SOL and EDL muscles showing fiber-type distribution using myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) reaction after preincubation at pH 4.5. SOL (I, type I; IC, type IC; IIC, type IIC; A, type IIA); EDL (I, type I; IIA, type IIA; AD, type IIAD; DB, type IID + type IIB) muscle fibers. Bar 40µm.

Electrophoretic separation of Myosin heavy chain (MHC)

MHC isoform analyze was performed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in duplicate (maximum 5 % of variation). Ten serial cross sections (12 μm thick) were collected from each muscle sample and placed in a solution (0.5 mL) containing glycerol 10 % (w/vol), 2-mercaptoethanol 5 % (vol/vol) and sodium dodecylsulfate (SDS) 2.3 % (w/vol) in a Tris/HCl buffer 0.9 % (pH 6.8) (w/vol). The final solution was shaken for 1 minute and heated for 10 minutes at 60 $^{\circ}\text{C}$ (Campos et al. 2002). Small quantities (30 μL) of the extracts were submitted to electrophoresis reaction (SDS-PAGE 7-10 %), using a 4 % stacking gel, for 26 hours at 180 V; the maximum current was limited to 13 mA. The gels were stained with Coomassie Blue (Bar and Pette 1988) and used to identify the isoforms according to their molecular weight. EDL muscle showed bands at the MHC I, MHC IIa, MHC IIc and MHC IIb levels and SOL muscle showed bands at the MHC I and MHC IIa levels (Fig. 2). The gels were photographed, the images captured by VDS Software (Pharmacia Biotech) and their relative percentages were quantified by densitometry using Image Master VDS Software (version 3.0). Identification of MHC isoforms was accomplished by comigration of plantaris muscle samples using a control animal as pattern.

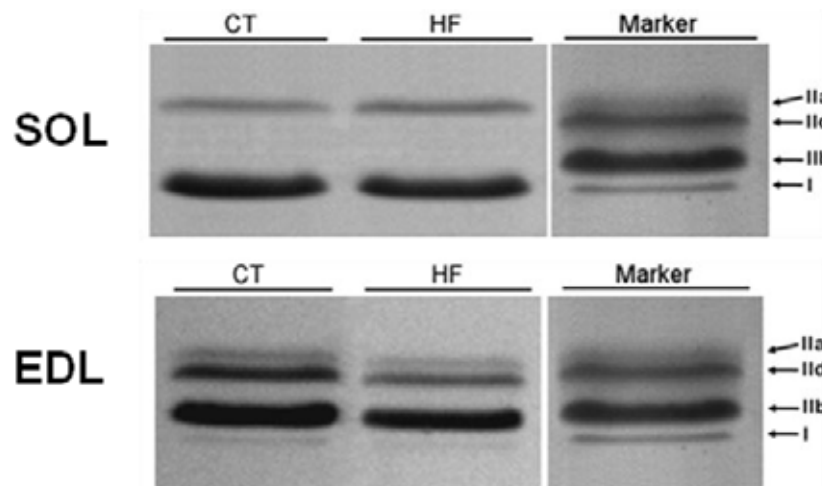


Fig. 2. Representative SDS-PAGE gel used to quantify MHC isoforms in SOL and EDL muscles from control (CT) and heart failure (HF) groups.

RNA isolation and analysis

Total RNA was extracted from SOL and EDL muscles with TRIzol Reagent (Invitrogen, USA). Frozen muscles were mechanically homogenized on ice in 1 ml ice-cold TRIzol reagent. Total RNA was solubilized in nuclease-free H₂O, incubated in DNase I (Invitrogen, USA) to remove any DNA present in the sample, and quantified by measuring the optical density (OD) at 260 nm. RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio of ~2.0. Degradation of RNA samples was monitored by the observation of appropriate 28S to 18S ribosomal RNA ratios as determined by GelRed staining of the agarose gels.

Reverse transcription

For each sample, cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA by using components from the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). The reaction contained 10 µl 10x Reverse Transcription Buffer, 4 µl 25x dNTPs, 10 µl 10x random primers, 100 units of RNase inhibitor (Applied Biosystems, USA), 250 units of MultiScribe™ Reverse Transcriptase, and the final volume was adjusted to 100 µl with nuclease-free H₂O. The primers were allowed to anneal for 10 min at 25 °C before the reaction proceeded for 2 h at 37 °C. Control “No RT” reactions were performed by omitting the RT enzyme. These reactions were then PCR amplified to ensure that DNA did not contaminate the RNA. The resulting cDNA samples were aliquoted and stored at -20 °C.

Real-Time qPCR

Two microliters of cDNA, corresponding to 20 ng of total RNA, from the Reverse transcription reaction were used as a template in the real-time qPCR, performed in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Cycling conditions were as follows: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The reactions were run in duplicate using 0.4 µM of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, USA) in a final volume of 25 µl. Primer sequences were designed using the Primer Express v3.0 software (Applied Biosystems, USA) and are listed in the Table 1. Melting

dissociation curves and agarose gel electrophoresis were performed to confirm that only a single product was amplified. Control reactions were run lacking cDNA template to check for reagent contamination. Relative gene expression was calculated using the Comparative CT Method (Livak and Schmittgen 2001). The gene expression and the most stable reference genes were obtained using geNorm (version 3.5, written by Vandesompele et al. 2002).

Table 1. Oligonucleotide primers used for Real-Time PCR amplification of reverse transcribed RNA

Product	Accession N°	Sequence (5' – 3')	PCR Length (bp)
MyoD	NM_176079.1	TTTTTCATGCGACTCACAGC	137
		GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG	
Myogenin	M24393.1	T GCCACAAGCCAGACTACCCACC	246
		CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA	
Acidic ribosomal phosphoprotein	NM_022402	CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG	74
		CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG	
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl	NM_012583	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	123
		GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	

Accession N°, GenBank accession number; *bp* base pairs

Biochemical study

Ten animals from each group were used for the biochemical study. Samples of 200 mg, SOL and EDL muscle were weighed and homogenized in 5 ml of cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Tissue homogenates were prepared in a motor-driven Teflon glass Potter Elvehjem tissue homogenizer (1 min. 100 rpm) immersed in ice water. The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min and supernatant was used to determine: Total protein (TP), lipid hydroperoxide (LH), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). LH was measured through hydroperoxide-mediated Fe²⁺ oxidation under acid conditions (Jiang et al. 1991). Samples were added to reaction mixtures containing 100µM xylenol orange, 250µM FeSO₄,

25 μ M H₂SO₄, and 4mM butylated hydroxytoluene (BHT) in 90% (v/v) methanol. The mixtures were incubated for 30 min at room temperature prior to measurement at 560nm. GSH-Px was assayed using 0.15 M, pH 7.0 phosphate buffer containing 5mM EDTA, 0.1 ml 0.0084M NADPH, 0.005 ml GSSG-reductase (Sigma), 0.01ml 1.125M NaN₃ (sodium azide), and 0.1 ml 0.15M GSH (Hopkins and Tudhope 1973). Superoxide dismutase activity was determined by the ability of the enzyme to inhibit reduction of nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma). NBT reduction rate in the absence of tissue was used as a reference. One unit of SOD was defined as the amount of protein needed to decrease the reference rate to 50% maximum inhibition. All data were expressed in SOD units per mg protein (Ewing and Janero 1995). Enzyme activities were determined using a microplate reader (Bio-tech Instruments INC USA). Spectrophotometric determinations were performed in a Pharmacia Biotech spectrophotometer (974213, Cambridge, England). All reagents were from Sigma (Sigma. St. Louis, MO, USA). The extinction coefficient for NADH at 340 nm was 6.22 μ mol⁻¹ cm⁻¹ and for DTNB at 412 nm was 13.6 mmol⁻¹ cm⁻¹.

Fatigue Resistance and Contractile Properties

The EDL muscle or SOL muscle preparations were removed and mounted for myographic recording in vitro, according to Gallacci and Oliveira (1994). The preparation was mounted vertically in a conventional isolated organ-bath chamber containing 25 mL of physiological solution of the following composition (mmol/L): NaCl, 135; KCl, 5; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; NaHCO₃, 15; NaH₂PO₄, 1; glucose, 11. This solution was bubbled with carbogen (95 % O₂ and 5 % CO₂), which kept the pH at 7.4 to 7.5, and maintained at 27 °C. The preparations were attached to isometric force transducers (Grass, FT03) for recording the twitch tension. The transducer signal outputs were amplified and recorded on computer via a transducer signal conditioner (Gould, 13-6615-50) with an AcquireLab Data Acquisition System (Gould). Once mounted in the test apparatus, muscles were allowed 10 min to equilibrate to the experimental temperature. A series of brief tetanic contractions were used to establish the muscle length that produces the maximum tetanic force. The isometric contractile properties of muscles and their resistance to fatigue were assessed in sequence. Direct contractions were evoked by supramaximal pulses (0.2 Hz, 4 ms and 30 V), delivered from an electrical stimulator (Grass,

S88), through a bipolar electrode positioned on opposite sides of the muscle. To avoid the interference of indirect contractions, these experiments were performed in the presence of pancuronium bromide (2×10^{-6} M). Fatigue resistance protocol consisted of 30 tetanic contractions. For EDL muscles the frequency was 200 Hz and for SOL muscle 120 Hz. The duration of tetani was 0.9 s for EDL and 1.5 s for SOL muscle. These combinations of pulse frequency and tetanus duration resulted in both muscles receiving the same number of stimulus pulses in each tetanus (Barclay 1992). Fatigue resistance was defined as the force developed in the last contraction of a series relative to the force in the first contraction and was expressed as a percentage. The contractile properties studied were amplitude, rise time and fall time of the first tetanic contraction. The rise time of contraction was determined between 10 % and 90 % of the development of maximum amplitude and the fall time was determined between 90 % and 10 % after maximum amplitude. Following recordings, muscles were dried and weighed. Force was normalized for muscle cross-sectional area.

Statistical analysis

Anatomical data, muscle fiber cross-sectional area, biochemical data and contractile properties values were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were made using the Student's unpaired t-test. Muscle fiber frequency, MHC isoform content values, gene expression and fatigue resistance values were expressed as median, maximum and minimum value. Comparisons between groups were using Mann-Whitney test (Zar 1999). Differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

Results

Presence of heart failure in the monocrotaline-treated rats

After 22 days, all monocrotaline treated rats showed heart failure at post-mortem, confirmed by atrium and right ventricular hypertrophies (RVW/BW > 0.80), pleural and pericardial effusions, and congested liver. No alterations were found in the control rats.

There was no significant difference in BW between HF and CT groups. Heart weight was increased in HF compared to CT, as demonstrated by LVW, RVW, and ATW and by the heart hypertrophy indexes (RVW/BW and ATW/BW) (Table 2).

Table 2. Anatomical data of CT and HF

	Experimental groups	
	CT (n=10)	HF (n=13)
BW (g)	166.83 ± 11.94	173.79 ± 15.66
RVW (mg)	133 (116; 153)	382 (346; 460) **
RVW/BW (mg)	0.79 (0.69; 0.80)	2.21(1.87; 2.64) **
LVW (mg)	395.00 (365; 462)	489.00 (417; 559) *
LVW/BW (mg)	2.38 (2.25; 2.71)	2.85 (2.29; 3.30) *
ATW (mg)	59.00 (46.00; 74.00)	129.00 (71; 169) **
ATW/BW (mg)	0.35 (0.26; 0.46)	0.85 (0.39; 0.99) **
SOL (mg)	91.00 ± 17.00	81.00 ± 11.00
SOL/BW (mg)	0.54 ± 0.08	0.46 ± 0.05 *
EDL (mg)	89.00 ± 8.00	76.00 ± 11.00 *
EDL/BW (mg)	0.54 ± 0.04	0.44 ± 0.04 **

*Values are means ± SD (BW, SOL, SOL/BW, EDL, EDL/BW) and median (maximum – minimum value) (RVW, RVW/BW, LVW, LVW/BW, ATW, ATW/BW); n: number of animals; CT: control group; HF: heart failure group; BW: body weight; LVW: left ventricle weight; RVW: right ventricle weight; ATW: atrium weight; EDL: extensor digitorum longus weight; SOL: soleus weight; * P<0.05 and **P<0.001; Statistical significance versus control group.*

Degree of muscles, fiber type frequency and atrophy

SOL and EDL atrophy index (SOL/BW; EDL/BW) were significantly decreased in the HF compared to the CT group (Table 2). Using the myofibrillar adenosine triphosphatase (mATPase) histochemical reaction, after preincubation at pH 4.2 and 4.5, in both muscles, all muscle fiber types showed CSA decreased in the HF compared to the CT group (P< 0.05) (Fig. 3 and 4). Muscle fiber frequency decreased only in IIC type in SOL muscle of HF compared to the CT group (Tables 3 and 4).

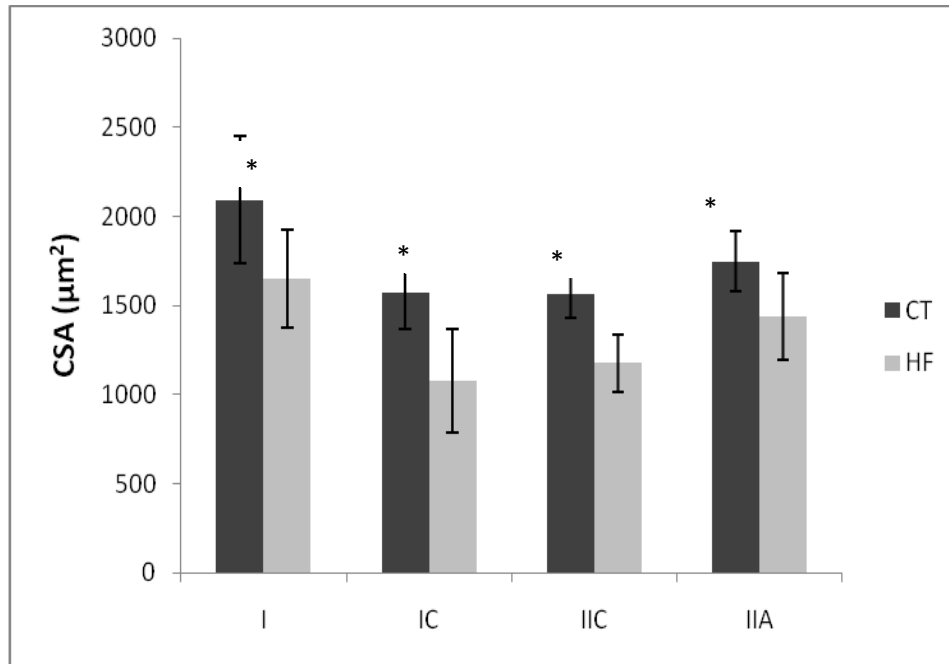


Fig. 3. Cross-sectional area (CSA; μm^2) of SOL muscle fiber types I, IC, IIC and IIA in control (CT, $n = 10$) and heart failure (HF, $n=10$) groups. Values are expressed as mean \pm SE. * $P < 0.05$: Statistical significance versus control group.

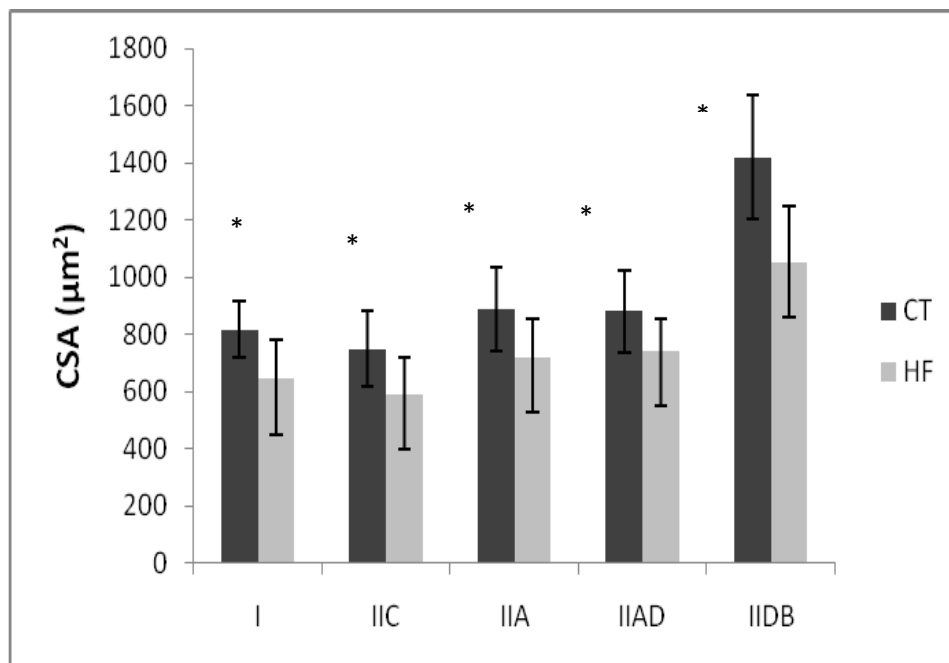


Fig. 4. Cross-sectional area (CSA; μm^2) of EDL muscle fiber types I, IIC, IIA, IIA/D, and IIDB in control (CT, $n = 10$) and heart failure (HF, $n = 10$) groups. Values are expressed as mean \pm SE. * $P < 0.05$: Statistical significance versus control group.

Table 3. Fiber-type frequency (I, IC, IIC, IIA) in SOL muscle from control (CT) and heart failure (HF) groups

Group	I	IC	IIC	IIA
CT	70,4(68,56-84,62)	7,2 (1,13-11,21)	2,8(2,02-9,72)	14,4 (10,98-22,50)
HF	77,5(66,18-81,87)	3,1(0,18-3,89)	1,7(0,18-2,43)*	17,1(13,20-31,56)

Values are median (maximum – minimum value) * $P < 0.05$; Statistical significance versus control group.

Table 4. Fiber-type frequency (I, IIC, IIDB, IIAD e IIA) in EDL muscle from control (CT) and heart failure (HF) groups

Group	I	IIC	IIA	IIAD	IIDB
CT	4,6 (1,3-5,9)	0,9 (-9,7-3,3)	15,1 (7,6-21,5)	5,2 (2,2-11,5)	74,8 (70,6-77,4)
HF	4,0 (1,9-5,5)	0,6 (0-2,3)	16,7 (12,8-20,8)	3,8 (2,9-5,2)	75,2 (69,2-78,9)

Values are median (maximum – minimum value) * $P < 0.05$; Statistical significance versus control group.

The representative SDS-PAGE gel used to quantify MHC isoforms is shown in the Fig. 2 and data from the two groups are summarized in the Tables 5 and 6. SOL muscle showed MHCI and MHCIIa isoforms; EDL muscle presented MHCI, MHCIIa, MHCIIb and MHCIIc isoforms. The percentage distribution of MHCs was not different between groups ($p > 0.05$).

Table 5. Percentage distribution of myosin heavy chain (MHC), I and IIa in SOL muscle from control (CT) and heart failure (HF) groups

Groups	MHC I	MHC IIA
CT	80.5 (72.7-88.1)	19.5 (11.9-27.3)
HF	78.9 (66.3-89.14)	21.1 (10.9-33.7)

Values are median (maximum – minimum value) * $P < 0.05$; Statistical significance versus control group.

Table 6. Percentage distribution of myosin heavy chain (MHC), I, IIa, IIc and IIb in EDL muscle from control (CT) and heart failure (HF) groups.

Groups	MHC I	MHC IIa	MHC IIc	MHC IIb
CT	6.7 (3.0-16,5)	7.0 (3.5-10.2)	26.2 (21.9-28.3)	57.4 (51.5-10.7)
HF	5.6 (3.2-12.2)	7.6 (3.9-9.9)	24.0 (14.8-31.6)	59.5 (51.4-75.8)

Values are median (maximum – minimum value) * $P < 0.05$; Statistical significance versus control group.

Gene Expression Analysis by RT-qPCR

The measurement of gene expression by RT-qPCR revealed that SOL muscle mRNA expression of Myogenin was significantly lower in the HF comparing to CT group. EDL muscle mRNA expression of MyoD was significantly decreased in the HF comparing to CT group (Fig. 5 and 6).

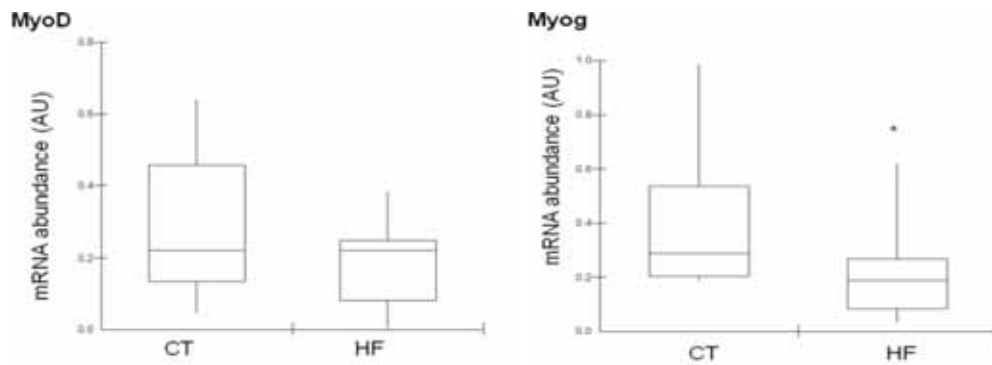


Fig. 5. mRNA abundance estimated by RT-qPCR of MyoD and Myogenin (Myog) in SOL muscle of the control (CT, $n=10$) and heart failure (HF, $n=10$) groups. Data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values. Gene expression was normalized to the reference gene Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and acidic ribosomal phosphoprotein (ARBP) from the same RT product. Normalized data are expressed in arbitrary units (AU). * $P < 0.05$; statistical significance versus control group.

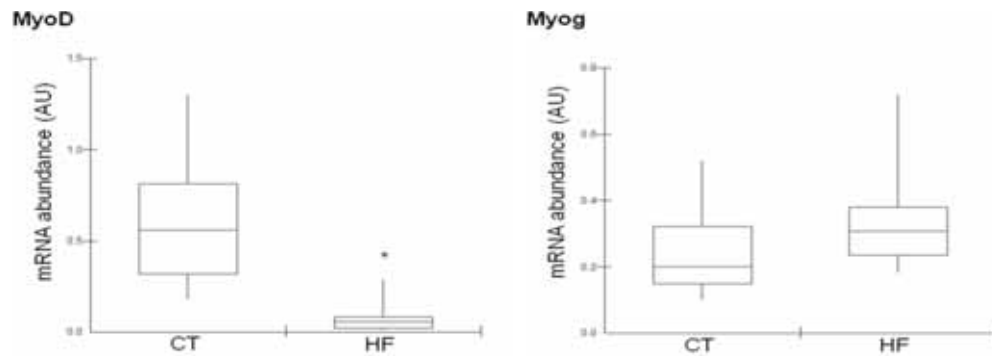


Fig. 6. mRNA abundance estimated by RT-qPCR of MyoD and Myogenin (Myog) in EDL muscle of the control (CT, $n=10$) and heart failure (HF, $n=10$) groups. Data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values. Gene expression was normalized to the reference gene Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and acidic ribosomal phosphoprotein (ARBP) from the same RT product. Normalized data are expressed in arbitrary units (AU). * $P<0.05$: statistical significance versus control group.

Biochemical analysis

SOL muscle in HF group showed increased lipid hydroperoxide, reduced superoxide-dismutase and glutathione peroxidase activity in comparison to CT group. In EDL muscle, lipid hydroperoxide, superoxide-dismutase and glutathione peroxidase activity was similar between groups (Table 7).

Table 7. Oxidative stress in SOL and EDL muscles in control (CT) and heart failure (HF) groups

	SOL		EDL	
	CT (n=10)	HF (n=10)	CT (n=10)	HF (n=10)
GSH-Px (U/mg of tissue)	100.26 ± 19.25	73.56 ± 15.69*	47.16 ± 13.53	50.04 ± 12.69
SOD (U/mg of tissue)	32.77 ± 3.95	24.66 ± 5.17*	33.3 ± 1.32	31.26 ± 3.60
HL (nmol/mg of tissue)	362.78 ± 49.29	429.14 ± 58.02*	460.47 ± 27.11	452.7 ± 42.07

Means ± SD; n - number of animals; GSH-Px - glutathione peroxidase; SOD - superoxide-dismutase; LH - lipid hydroperoxide. * $P<0.05$; Statistical significance versus control group.

Contractile Properties and Fatigue Resistance Tests

The fall time was prolonged in the HF group comparing to the control group, only in the SOL muscle (Table 8). However, there were no significant changes in the amplitude, rise time and the fatigue resistance of EDL and SOL muscles in the HF group comparing to control (Tables 8 and 9).

Table 8. Contractile properties of directly evoked twitches in SOL and EDL muscles in control (CT) and heart failure (HF) groups

	SOL			EDL		
	RT (ms)	FT (ms)	TA (g/mm ²)	RT (ms)	FT (ms)	TA (g/mm ²)
CT	28.5	89.5	29.3	12.52	25.68	21.77
(n=10)	± 5.0	± 10.3	± 13.7	± 0.39	± 4.41	± 9.53
HF	30.0	119.5	25.7	12.50	27.3	24.18
(n=10)	± 6.1	± 32.0*	± 11.3	± 0.25	± 5.07	± 5.07

*Means ± SD; n - number of animals; RT – Rise time of twitch; FT – Fall time of twitch; TA – Twitch amplitude * P<0.05; Statistical significance versus control group.*

Table 9. Fatigue resistance evaluated from the decrease of 30 direct contractions in SOL and EDL muscle in control (CT) and heart failure (HF) groups

	Fatigue resistance	
	SOL	EDL
CT (n=10)	0.36 (0.47-0.25)	0.36 (0.57-0.22)
HF (n=10)	0.35 (0.71-0.24)	0.34 (0.50-0.27)

*Median (maximum and minimum value); n - number of animals; Amplitude of directly evoked tetanus were expressed as a percentage to the initial amplitude * P<0.05; Statistical significance versus control group.*

Discussion

The aim of this study was to investigate and to compare the morphofunctional characteristics in SOL and EDL muscles in a monocrotaline-induced heart failure. The major finding in this study is that monocrotaline-induced heart failure promoted distinct alterations in skeletal muscles with distinct morphofunctional characteristics. These alterations were higher in oxidative (SOL) than in glycolytic (EDL) muscles. We showed atrophy in SOL and EDL muscles, oxidative stress, down-regulation in myogenin mRNA expression and prolongation of fall time of tetanic contraction only in SOL muscle; down-regulation in MyoD mRNA expression occurred only in EDL muscle.

Skeletal muscle atrophy in HF has been commonly described in clinical (Anker et al., 1999; Mancini et al. 1992; Sullivan et al. 1990), and experimental studies (Carvalho et al. 2003; Dalla Libera et al. 2004; Delp et al. 1997; Schulze et al. 2003). However, skeletal muscle atrophy is dependent on the model of HF used and muscle type examined. In experiments using the monocrotaline to induce HF in rats, there was no atrophy in the diaphragm (Lopes et al. 2008), but the EDL muscle showed atrophy (Carvalho et al. 2006; Carvalho et al. 2010). Martinez et al. (2010) observed atrophy, in the SOL muscle, in rats with HF induced by myocardial infarction. Carvalho et al. (2003) showed muscle atrophy in rats with HF induced by aortic stenosis (AS). In our study, HF promoted SOL and EDL muscle atrophy, after 22 days from monocrotaline treatment.

Some factors seem to be involved in muscle atrophy in HF, as disuse conditions (Gundersen & Merlie 1994), aging (Alway et al. 2002), physical activity and neuromuscular reduced, systemic activation of neurohormones and inflammatory cytokines (Dalla Libera et al. 2001; Fillipatos et al. 2005; Toth et al. 2006). Preliminary experiments conducted in our lab showed that skeletal muscle atrophy in HF may be involved with changes in the MRFs gene expression (Carvalho et al. 2006; Martinez et al. 2010), and changes in the atrogenes MAFbx / atrogen - 1 and Murf1 (Carvalho et al. 2010).

In our experiment, the increased in the LH and decreased antioxidant enzymes activity (GSH-Px and SOD) in the SOL muscle of HF group indicates an increased oxidative stress in this muscle. In EDL muscle, the activity of these enzymes was not change. Oxidative stress in skeletal muscle play an important role related to the structural and functional changes (Barreiro et al. 2005; Kaasik et al. 1999).

Muscles with different metabolic characteristics present distinct antioxidant defense; in those with a predominance of oxidative and slow muscle fibers the antioxidant enzyme activity is higher than in the muscle with a predominance of glycolytic and fast fibers (Semba et al. 2007). Mancini et al. (1989) demonstrated a decrease in antioxidant enzyme activities, increased frequency of fast twitch fibers and decrease in the frequency of slow twitch fibers, in gastrocnemius muscle, in patients with HF; these characteristics were also observed in gastrocnemius muscle, in rats with HF induced by myocardial infarction (Brunotte et al. 1995). In HF induced by monocrotaline, model used in our study, the decrease in the antioxidant enzymes activity and the increase in LH only in the SOL muscle indicate that HF effects was more pronounced in this muscle, fact that could have contributed to the contractile properties in this muscle.

The decrease in mRNA expression of myogenin in the SOL and MyoD in the EDL muscle of HF group may be related to the muscle atrophy observed in these muscles (Carvalho et al. 2006; Martinez et

al. 2010). These MRFs are involved in the embryonic and adult myogenesis, controlling the myoblasts or satellite cells activity, respectively. MRFs also are involved in the maintenance of the muscle fibers phenotype fast and slow; the myogenin is more expressed in slow muscles, whereas MyoD is more expressed in fast muscles (Hughes et al. 1993; Megeney & Rudnicki, 1995; Murre et al. 1989; Voytik et al. 1993). Thus, the significant decrease in mRNA expression of MyoD and myogenin in EDL and SOL muscles may indicate a change in the satellite cells proliferation and differentiation that in turn culminated with the muscles atrophy.

In the HF, changes in the skeletal muscle phenotypic characteristics frequently occur (Dalla Libera et al. 2009; Vescovo et al. 1998) with a decrease in the slow and increase in the fast type fibers, which makes the muscle faster. In our study, there was a significant decrease in the frequency of hybrid-type IIC fibers in the SOL muscle. This decrease was not accompanied by a significant increase in the frequency of fiber type IIA. Electrophoresis analysis showed a tendency to decrease the relative percentage of MHC I and increase in the relative percentage of MHC IIA. Therefore, we believe that in the acute model of HF used in our study, there was a tendency of the SOL muscle in acquiring the fast phenotype. This statement is in according to the gene expression results.

In relation to the contractile properties, there were no changes in the fatigue resistance and muscular maximum amplitude in the muscles studied in HF. De Sousa et al. (2001) showed no changes in contractile properties in SOL muscle in rats with HF induced by aortic stenosis. However, the fall time of contraction in the SOL muscle in HF group was higher compared to the control group. This finding is in according to Ertunc et al. (2009) which showed that HF leads the prolongation of twitch fall time only in SOL muscle. Kuno et al. (1988) reported that muscles with higher proportions of type II fibers (fast twitch and glycolytic metabolism) have higher fall time compared to muscles with a predominance of type I fibers (slow twitch and oxidative metabolism). Thus, our findings regarding the SOL muscle confirm the trend in purchasing the faster phenotype in this muscle, in the monocrotaline-induced HF.

In conclusion, our results indicate that the HF induced by monocrotaline promoted biochemical, morphological and functional changes, more prominent in the SOL, a slow-twitch muscle. Although further experiments are required for better determine the mechanisms involved in the pathophysiology of Heart Failure, our results contributes to the understanding of the muscle-specific changes that occur in this syndrome.

References

Allen DL, Sartorius CA, Sycuro LK, Leinwands LA. (2001) Different pathway regulate of the skeletal myosin heavy chain. *J Biol Chem* 274: 43524-43533.

Alway S.E., Degens H., Lowe D.A., Krishnamurthy G. (2002) Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282:R411–R422.

Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, Leyva F, Rauchhaus M, Kemp M, Teixeira MM, Hellewell PG, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1999) Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J* 20:683-693

Barclay CJ (1992) Effects of fatigue on rate of isometric force development in mouse fast- and slow- twitch muscle *Am J Physiol* 263 (Cell Physiol. 32): C1065-C1072.

Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SNA, Gea, J (2005) Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1116–1124.

Bärr A, Pette D (1988) Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 233:153-155.

Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18:670-672.

Brunotte F, Thompson CH, Adamopoulos S, Coats A, Unitt J, Lindsay D, Kaklamanis L, Radda GK, Rajagopalan B (1995) Rat skeletal muscle metabolism in experimental heart failure: effects of physical training. *Acta Physiol Scand.* 154:439-47.

Campos GE, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, Ragg KE, Ratamess NA, Kraemer WJ, Staron RS (2002) Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol* 88:50–60.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, De Assis JM, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol.* 84:201-6.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, Lopes FS, Sugizaki MM, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M (2006) Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 87:219-225.

Carvalho RF, Castan EP, Coelho CA, Lopes FS, Almeida FL, Michelin A, de Souza RW, Araújo JP Jr, Cicogna AC, Dal Pai-Silva M (2010) Heart failure increases atrogen-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy *J Mol Histol* 41:81-7.

Coats AJS, Clark AL, Piepoli M, Volterrani M, Poole-Wilson PA. (1994) Symptoms and quality of life in heart failure. The muscle hypothesis. *Br Heart J* 72:36–9.

Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecar-pentier Y (2007) Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1009–H1017.

Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G. (2001) Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol* 33:1871-1878.

Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Della Barbera M, Angelini A. (2004) Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C138-144.

Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Betto DD, Germinario E, Angelini A, Vescovo G. (2005) Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective of Carvedilol. *J. Molecular and Cellular Cardiology* 38:803-807.

Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Betto DD, Germinario E, Angelini A, Evangelista S, Vescovo G. (2010) Skeletal muscle in chronic right heart failure in rat: can different beta-blockers prevent it to the same degree? *Int J Cardiol* 143:192-199.

De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R (2000) Heart failure affects mitochondrial but not intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation* 102:1847-1853.

De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Serrurier B, Ventura-Clapier R (2001) Dual influence of disease and increased load on diaphragm muscle in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33:699-710.

Delp M, Duan C, Mattson JP, Musch TI (1997) Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiology* 83:1291-1299.

Drexler H (1992) Skeletal muscle failure in heart failure. *Circulation*. 85:1621–1623.

Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, Gundersen K (2003) Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol* 548 (Pt1):259-269.

Ertunc M, Sara Y, Onur R (2009) Differential Contractile Impairment of fast-and slow-twitch skeletal muscle in a rat model of doxorubicin-induced congestive heart failure. *Pharmacology* 84:240-248.

Ewing JF & Janero DR (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Annals of Biochemistry* 232: 243-248.

Feuers, RJ, (1998) The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 125, 192–201.

Filippatos G.S., Anker S.D., Kremastinos. (2005) Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(3):249-254.

Gallacci M, Oliveira AC, (1994) Pre- and postsynaptic mechanisms involved in tetanic fade induced by pancuronium in the isolated rat muscle. *Pharmacology* 49, 265–270.

Gundersen K, Merlie JP (1994) Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy. *Proc Natl Acad Sci* 91:3647–3651.

Guth L, Samaha FJ (1969) Qualitative differences between acto myosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 25:138–152.

Hopkins J, Tudhope GR (1973) Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *British Journal of Haematology* 25:563-575.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118:1137-1147.

Hughes S.M., Chi M.M., Lowry O.H., Gundersen K. (1999) Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol* 145:633-642.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf SP (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26: 853-856.

Kaasik A, Minajeva A, De Sousa E, Ventura-Clapier R, Veksler V. (1999) Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. *FEBS Lett* 444:75–77.

Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, Utsumi H, Takeshita A (2000) Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87:392–398.

Kuno S, Katsuta S, Anno I, Matsumoto K, Akisada M. (1988) Relationship between MR relaxation time and muscle fiber composition. *Radiology* 169:567-68.

Lapu-Bula, Ofili E (2007) From hypertension to heart failure: role of nitric oxide-mediated endothelial dysfunction and emerging insights from myocardial contrast echocardiography. *Am J Cardiol* 26:7–14.

Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfuss A, Ponicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE (2002) Ventricular hypertrophy plus neurohumoral activation is necessary to alter the cardiac beta-adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res* 91:1056–1062

Lipkin DP, Jones DA, Round JM, Poole-Wilson PA (1988) Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 18:187-195.

Lopes FS, Carvalho RF, Campos GER, Sugizaki MM, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC, Dal Pai-Silva M (2008) Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Path*, 89:216–222.

Mancini DM, Coyle E, Coggan A, Beltz J, Ferraro N, Montain S, Wilson JR (1989) Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation* 80:1338-46.

Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR (1992) Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure *Circulation* 85:1364-1373.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Padovani CR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, (2010) Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors *Med Sci Monit.* 16:BR374-383.

Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73:723-732.

Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.

Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T (1998) Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 135:115–120.

Parker MH, Seale P, Rudnicki MA (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 4:497-507.

Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C (1999) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 31:987–997.

Reindel JF, Ganey JG, Wagner Rf, Slocombe RF, Roth AR (1990) Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lung of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol. Appl Pharmacol* 106:179-200.

Schulze P.C, Gielen S, Adams V, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S, Kratzsch J, Hambrecht R, Schuler G. (2003) Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulin-like growth factor-1 in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98:267-274.

Semba RD, Lauretani F, Ferrucci L (2007) Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458:141-145.

Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE (2004) Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *J Appl Physiol* 97:277-285.

Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR (1990) Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 81:518-527.

Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH (2002) Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol* 87:182-186.

Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111:117-123.

Toth MJ, Palmer BM, Lewinter MM (2006) Effect of heart failure on skeletal muscle myofibrillar protein content, isoform expression and calcium sensitivity. *Int J Cardiol* 107:211-219.

Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, Nakamura K, Ichikawa K, Utsumi H, Takeshita A (2001) Enhanced Generation of Reactive Oxygen Species in the Limb Skeletal Muscles From a Murine Infarct Model of Heart Failure *Circulation*; 104:134-136.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2008) Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure *Suppl A*: A31-A37.

Van Albada ME, Bartelds B, Wijnberg H, Mohaupt S, Dickinson MG, Schoemaker RG, Kooi KA, Gerbens F, Berger RM (2010) Gene expression profile in flow-associated pulmonary arterial hypertension with neointimal lesions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298:L483-L491

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:34.

Vescovo G, Harding SE, Jones M, Dalla Libera L, Pessina AC, Poole-Wilson PA (1989) Contractile abnormalities of single right ventricular myocytes isolated from rats with right ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 21(Suppl 5):103-111

Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, Libera LD (1998) Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res* 39:233-241

Vescovo G, Ravara B, Libera LD (2008) Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure. *Basic Res Cardiol* 103:285-290.

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. *Dev Dynam* 198:214-224.

Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall New Jersey, 633p.