

**ANÁLISE DOS RECEPTORES DE ACETILCOLINA (nAChRs)  
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO AERÓBICO**

**Paula Aiello Tomé de Souza**

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

Orientadora: *Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE DOS RECEPTORES DE ACETILCOLINA (nAChRs)  
NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS COM  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA SUBMETIDOS AO  
TREINAMENTO AERÓBICO**

**Paula Aiello Tomé de Souza**

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

Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e  
Funcional.

Orientadora: *Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva*

Co-Orientadora: *Dra. Selma Maria Michelin Matheus*

Pesquisa Financiada pela FAPESP.

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**

Souza, Paula Aiello Tomé de.

Análise dos receptores de acetilcolina (nAChRs) na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca submetidos ao treinamento aeróbico / Paula Aiello Tomé de Souza. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Maeli Dal Pai Silva.

Capes: 20600003

1. Insuficiência cardíaca. 2. Coração – Doenças. 3. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Músculo Estriado Esquelético. Insuficiência Cardíaca. Treinamento Aeróbico. Junção Neuromuscular. Receptor Nicotínico de Acetilcolina.

*“Aos meus pais, José Moacir e Aparecida,  
pelo carinho e amor em todos os momentos”*

## **AGRADECIMENTOS**

Como diz nosso amigo *Charles Charlin*:

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e  
não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.

Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.

Quero iniciar agradecendo à **DEUS**, por esta oportunidade tão importante em minha vida profissional e pessoal. Por me dar a vida e a saúde todos os dias para o trabalho, para aprender e ensinar, por simplesmente *Viver*.

Quero agradecer a Ele por ter a oportunidade de realizar MESTRADO na UNESP e passar na vida das pessoas que trabalham nesta instituição, fazendo parte do Departamento de Morfologia/UNESP/IBB.

Como iniciar, por quem devo começar a agradecer?

Foram tantas e são tantas as pessoas que fazem os meus dias mais cheios de alegria, prazer e doação. Não quero ser injusta em me esquecer de alguém, mas tenho a certeza que coloco a todos no coração de Deus para uma benção especial por este tempo de convivência e amizade.

Vamos lá...

À você minha orientadora *Profa. Maeli Dal Pai Silva*, tão cheia de valores, minha admiração e carinho, por todo o crescimento profissional, sempre muito inspirador para minha carreira. Amiga, afetiva e sensível nos momentos de partilha sobre família, afetividade. Obrigada pela sua amizade e oportunidade que me dá a cada dia em ser melhor para o outro.

À você minha co-orientadora *Profa. Selma Maria Michelin Matheus*, foi por você que iniciei minha vida acadêmica, me apaixonei pela pesquisa. Obrigada! Para sempre vou me lembrar de você! Dá tudo certo Paula! Você pode fazer melhor! Generosa, Dedicada, Amiga.

Aos colegas do LBME - Laboratório Biologia do Músculo Estriado Ludmila, Edson, Ivan, Raquel, Tatá, Bruno, Fer Carani, Leonardo, Geyson, ao *Prof. Robson*, pelo empenho, inovação e harmonia no ambiente de trabalho, também pela amizade fora dele.

Não posso deixar de agradecer de forma muito especial a vocês *Rodrigo, Luana e Warlen* pela oportunidade de aprender a conviver, a rir, a chorar, a se desesperar e a ter paciência. Valeu por todo o tempo de convívio, partilhas durante o treinamento dos animais. Não irei esquecer os 3 pontos na mão direita pela mordida do rato no. 18 rrsrs... Com certeza, me tornei mais profissional neste tempo. Que a nossa amizade não seja só profissional, mas possa continuar por muitos anos. A você *Luana*, chamada de Bebê pelo *Prof. Cicogna*, meiga e sempre pronta a ajudar, continue assim... e a você *Warlen*, nosso amigo Fanfas, que de fanfarrão não tem nada!!! Super responsável, maduro e companheiro. Pude aprender o valor da orientação. Desejo muito sucesso e realização.

Vale muito ter amigos assim!!!

Tenho a certeza que tenho aprendido muito!!!!

Gostaria de agradecer as pessoas que fazem parte da minha vida e a outras que nem tanto, mas que com certeza deixam suas marcas.

**OBRIGADA A TODOS**, que convivi neste período tão importante.

## QUERO CONTINUAR...

Agradecendo aos meus pais, *José Moacir e Aparecida*, pelo apoio emocional, pelo *Porto Seguro e Exemplo* que sempre foram e serão para mim. Esta oportunidade de REALIZAÇÃO da garra, determinação que inspiro de vocês. Esta vitória é de vocês pelo carinho, empenho nas longas conversas sobre minha profissão. Não desista! Vai passar! Tenha paciência! Aproveite as oportunidades! Amo vocês demais e são para mim MEU MAIOR TESOURO!

À você meu irmão *Tiago*, obrigada por ouvir meus conflitos e me encorajar sempre. Meu amigo, sei que posso contar sem medidas. Você é inspiração quando me falta a criatividade rsrs... Vc é incrível, tenho orgulho demais. Tão menino e vive me dando lições de moral. Te amo TITO!!!

À você *Meu Amor, Fabiano*, como gosto de chamar-te *Meu Amor*. Você é para mim a *esperança* e a *realização* de um plano de amor de **Deus** em nossas vidas. Essa união não é por Acaso! Obrigada por me ouvir todos os dias ao telefone, por seus ensinamentos de vida para me tornar melhor para você. Obrigada por não desistir de nós, mesmo tão longe, quando a solidão aperta. Obrigada por seus carinhos e por cuidar de mim. Eu amo os seus cuidados! Você me ajuda a ser melhor e me torna mais completa! Com você não tenho medo de ser feliz, me inspira e me leva a amar *sempre, mais e mais*.  
*TE AMO DEMAIS, MEU NOIVO!*

À *FAPESP* pela oportunidade de desenvolver este trabalho e apresentar trabalho no exterior – *Córdoba, Argentina em 2011*.

Ao *Prof. Cicogna, Prof. Katashi e ao Dijon* pela disposição em compartilhar o biotério da Clínica Médica, pelos ecocardiogramas realizados no HC/UNESP e pela habilidade em realizar as cirurgias de estenose aórtica. Obrigada!!!!  
Que possamos continuar trabalhando juntos por muitos anos....

Aos que eventualmente ficaram de fora, porque sabem como eu sou *DISTRAÍDA*... rsrs...

OBRIGADA!!!!

*Peço à Deus,*

Que eu continue deixando mais de *Mim* por onde passo e

levando um pouquinho do *Nós* no caminho por onde eu vier a passar.

## RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome iniciada por uma redução na função cardíaca e caracterizada pela ativação de mecanismos compensatórios e atrofia. Fadiga e dispnéia são os sintomas mais comuns desta doença, e estão associados à miopatia do músculo esquelético; ocorre redução da capacidade oxidativa, mudança nas fibras do tipo I para tipo II, alteração na expressão dos fatores reguladores miogênicos (MRFs) e na JNM. O treinamento físico aeróbico é considerado uma conduta amplamente aceita para minimizar as consequências dos sintomas causados pela IC, com melhora na qualidade de vida e pode reverter anormalidades do músculo cardíaco e esquelético, além de modular a junção neuromuscular. O músculo diafragma é o mais importante músculo inspiratório dos mamíferos sendo um dos mais acometidos na IC; o treinamento físico aeróbico altera as propriedades eletrofisiológicas do diafragma durante a fadiga e favorece a resistência muscular. A hipótese do presente estudo é que as alterações fenotípicas musculares que ocorrem na IC estão associadas com alterações na distribuição e expressão dos nAChRs e que o treinamento físico aeróbico atenua estas alterações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição e expressão dos nAChRs em ratos com IC submetidos ao treinamento aeróbico. Foram utilizados 44 ratos Wistar machos (90 a 100g), divididos em quatro grupos experimentais: controle (C), treinamento aeróbico (TR), estenose aórtica (EAo) e estenose aórtica com treinamento aeróbico (EAoTR). A estenose aórtica foi induzida pela inserção de um clip de prata de 0.6 mm de diâmetro na aorta ascendente. Após 18 semanas da cirurgia, os animais com EAo, foram avaliados por ecocardiograma para verificar a hipertrofia do VE. Os demais animais foram divididos aleatoriamente em C, TR e EAoTR. Os animais selecionados para o grupo TR e EAoTR foram submetidos ao treinamento aeróbico em esteira por dez semanas (5 dias/semana). O músculo diafragma foi utilizado para a avaliação da expressão gênica das subunidades ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$ ) dos nAChRs e dos MRFs (Miogenina e MyoD) e expressão protéica das subunidades ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ) dos nAChRs e dos MRFs (Miogenina e MyoD) por PCR em Tempo Real e Western Blot, respectivamente. Também foi avaliada a distribuição dos nAChRs e do terminal nervoso com imunomarcagem usando  $\alpha$ -bungarotoxina associada a rodamina e anti-neurofilamento, respectivamente. Após a imunomarcagem a análise foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser e a análise da área dos nAChRs foi realizada pelo software Image J. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$  no grupo EAo e uma diminuição da expressão das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$  no grupo EAoTR. Somente a subunidade  $\epsilon$  obteve maior expressão no grupo EAoTR. Não houve alteração significativa na expressão dos MRFs (MyoD e Miogenina) nos grupos estudados. A imunomarcagem dos nAChRs revelou que não houve diferença quanto a morfologia dos receptores que apresentaram uma distribuição na forma de braços contínuos ou “pretzel”. A análise da área mostrou uma modulação na distribuição dos nAChRs, sendo maior nos grupos EAo (20 a 30  $\mu\text{m}^2$ ) e EAoTR (31 a 40  $\mu\text{m}^2$ ). Nossos resultados mostraram que na IC ocorrem alterações na distribuição e na expressão das subunidades dos receptores de ACh (nAChRs). O treinamento aeróbico foi benéfico e atenuou as alterações na expressão das subunidades dos nAChRs. Este protocolo de treinamento poderia ser utilizado na intervenção de terapias futuras para a melhoria da qualidade de vida em pacientes com insuficiência cardíaca.

**Palavras-chave:** Músculo estriado esquelético. Insuficiência cardíaca. Treinamento aeróbico. Junção neuromuscular. Receptor nicotínico de acetilcolina.

## ABSTRACT

Heart failure (HF) is a syndrome initiated by a reduction in cardiac function and characterized by the activation of compensatory mechanisms and muscle myopathy. Fatigue and dyspnea are the most common symptoms of this disease, associated with the reduction of the oxidative capacity, changes in the fibers type I to type II, alterations in the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and in the neuromuscular junction (NMJs). Aerobic training is considered a widely accepted practice to minimize the consequences of the symptoms caused by HF, improving the life quality and can reverse abnormalities of cardiac and skeletal muscle, and modulate the NMJ. The diaphragm is the most important inspiratory muscle in mammals and is one of the most affected in HF; aerobic training changes the electrophysiological properties of the diaphragm during fatigue and promotes muscle endurance. Thus, the hypothesis of this study is that the changes that occur in HF are associated with alterations in the NMJs, in the expression of nAChRs and aerobic training can attenuate these changes. The aim of this study was to evaluate the distribution and the expression of nAChRs subunits in rats with HF submitted to an aerobic training. We used 44 male wistar rats (90 to 100g), divided into four groups: Control (C), Aerobic Training (TR), Aortic Stenosis (AS) and Aortic Stenosis with Aerobic Training (ASTR). Aortic stenosis was induced by the insertion of a silver clip of 0.6 mm in diameter in the ascending aorta. After 18 weeks of surgery, the animals with AS were evaluated by echocardiography for evaluating LV hypertrophy. The others were randomly divided into C, TR and ASTR groups. The animals of TR and ASTR groups were submitted to aerobic training on a treadmill for 10 weeks (5 days/ week). The diaphragm muscle was used to assess the expression of the nAChRs subunits ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta 1$ ) and MRFs (Myogenin and MyoD) by RT-qPCR and Western blot. We also analyzed the distribution of nAChRs and terminal axon along the muscle fiber with immunostaining using  $\alpha$ -bungarotoxin associated with rhodamine and anti-neurofilament, respectively. After the immunostaining, the analysis was performed using laser scanning confocal microscope and the area of nAChRs was measured using the Image J software. Our results showed an increase in the mRNA of  $\gamma$  subunits,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta 1$  in the AS group and decreased expression of  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta 1$  and  $\delta$  in the ASTR group. Only the  $\epsilon$  subunit expression in the group ASTR was more expressed. The expression of the MRFs, Myogenin and MyoD did not change in the groups studied. The immunostaining of nAChRs revealed that there was no difference in the morphology of the receptors that show a distribution as a continuous branches or pretzel. The area analysis revealed a modulation in the distribution of nAChRs, being high in AS (20 at  $30 \mu\text{m}^2$ ) and ASTR (31 at  $40 \mu\text{m}^2$ ) groups. Our study showed changes in the distribution and expression of nAChRs subunits during heart failure. Aerobic training was beneficial and attenuated nAChRs subunits changes in the neuromuscular junctions. This protocol could be critical to the intervention of future therapies for life quality improvement in patients with heart failure.

**Keywords:** Skeletal muscle. Heart failure. Aerobic training. Neuromuscular junction. Nicotinic acetylcholine receptors.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Características da Junção Neuromuscular .....	10
1.2 Características do Músculo Estriado Esquelético .....	14
1.2.1 Características do Músculo Diafragma .....	20
1.3 Características da Insuficiência Cardíaca .....	21
1.4 Características do Treinamento Aeróbico .....	22
1.5 Características do Treinamento Aeróbico na Insuficiência Cardíaca .....	24
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
3.1 Animais e grupos experimentais .....	30
3.2 Protocolo Experimental.....	30
3.3 Determinação do Limiar de Lactato.....	31
3.4 Protocolo de Treinamento .....	32
3.5 Ecocardiograma.....	33
3.6 Parâmetros Anatômicos.....	34
3.7 Análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser .....	34
3.8 Avaliação da Expressão Gênica e Protéica dos nAChRs .....	36
3.8.1 Expressão gênica dos nAChRs por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	36
3.8.2 Expressão protéica dos nAChRs por Western Blot.....	39
4 REFERÊNCIAS .....	42
5 CAPÍTULO 1: <i>Aerobic training improves cardiac function and change the expression of nAChRs in the diaphragm muscle of rats with heart failure</i> .....	54
6 CONCLUSÕES.....	86

## ***1 INTRODUÇÃO***



## 1.1 Características da Junção Neuromuscular (JNM)

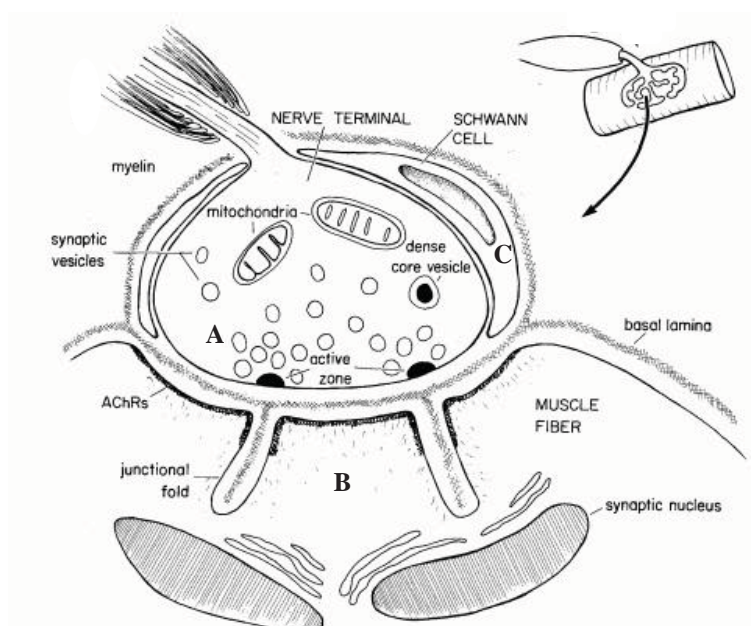
A Junção Neuromuscular (JNM) é uma sinapse química anatomicamente e funcionalmente diferenciada para a transmissão de um sinal do terminal nervoso para a fibra muscular (ENGEL, 2003). Na região de contato, o potencial de ação do nervo ocasiona a liberação de um neurotransmissor químico, a Acetilcolina (ACh), que atua nos nAChRs na membrana pós-sináptica e promove uma transmissão sináptica efetiva (WILLMANN; FUHRER, 2002) levando a contração muscular.

Há várias décadas a junção neuromuscular dos vertebrados vem sendo utilizada como um modelo para estudo da estrutura, função, desenvolvimento e plasticidade das sinapses devido a sua morfologia simples e fácil acessibilidade. A manutenção, o funcionamento e a regeneração do músculo estriado esquelético dependem da integridade desta sinapse, aumentando assim, a importância no conhecimento da sua arquitetura estrutural e molecular (KOIRALA; REDDY; KO, 2003).

Morfologicamente, as JNMs são formadas por três compartimentos (Figura 1): o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes a terminação nervosa e a célula de Schwann (representada pelo seu núcleo); o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal; e o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcolema da fibra muscular com as dobras juncionais e o sarcoplasma que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica (ENGEL, 2003).

No compartimento pré-sináptico, o axônio motor próximo à fibra muscular, perde sua bainha de mielina e se ramifica de modo variável em botões sinápticos que se alojam em depressões localizadas na superfície da fibra muscular que constituem a goteira sináptica (HALL; SANES, 1993). Cada botão sináptico contém vesículas sinápticas, mitocôndrias, microtúbulos, neurofilamentos, REL, glicogênio, e lisossomos (Figura 1) estando envolvido por processos das células de Schwann que o protege de lesões químicas e mecânicas (SANES; LITCHMANN, 1999).

As vesículas sinápticas apresentam em média 50-60 nm de diâmetro, são sintetizadas pelo corpo celular dos neurônios motores e transportadas ao longo do axônio para o terminal nervoso (BOOJ et al., 1986). Estas vesículas contêm ACh, ATP e uma alta concentração de íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{2+}$  (WHITTAKER, 1984). Essas vesículas tendem a se agrupar próximas a membrana pré-sináptica, em um local denominado de zona ativa (Figura 1). Neste local ocorre a fusão da vesícula com a membrana pré-sináptica para liberar a ACh na fenda sináptica por exocitose (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).



**Figura 1.** A Junção Neuromuscular. O terminal nervoso perde a bainha de mielina formando botão sináptico na superfície da fibra muscular. Especializações dos 3 tipos de célula que constituem a sinapse: (A) Terminal Nervoso (motoneurônio), (B) Fibra Muscular e (C) Célula de Schwann.  
Fonte: Adaptado de Hall e Sanes (1993).

O compartimento extracelular está situado entre a membrana pré-sináptica e pós-sináptica. Ele se constitui de uma estreita fenda. A fenda sináptica primária é limitada de um lado pelo terminal nervoso e de outro, pela fibra muscular, sendo ocupada pela lâmina basal sináptica. Esta é contínua com a lâmina basal que envolve a fibra muscular e as células de Schwann e estende-se entre as dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico, na fenda sináptica secundária (Figura 1) (HALL; SANES, 1993). A lâmina basal sináptica contém proteínas distintas daquelas encontradas na lâmina basal extrasináptica, proteínas específicas, tais como Acetilcolinesterase (AChE), Agrina, laminina-4, laminina-9, laminina-11, colágeno IV que a tornam bioquimicamente especializada e importante para o desenvolvimento e função da JNM (SLATER, 1990; PATTON et al., 1997; PATTON, 2003; SANES, 2003). Outras proteínas como ARIA, colágeno III, proteoglicanos, heparan-sulfato, N-CAM presentes na fenda sináptica são responsáveis pela estabilidade e agregação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) no sarcolema da fibra muscular. (ENGEL, 2003).

A acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima presente na fenda sináptica responsável por hidrolisar a Acetilcolina, em AcetilCoA + Colina, que se liga aos nAChRs permitindo aos receptores tornarem-se receptivos (SANES, 2003) (Figura 2).

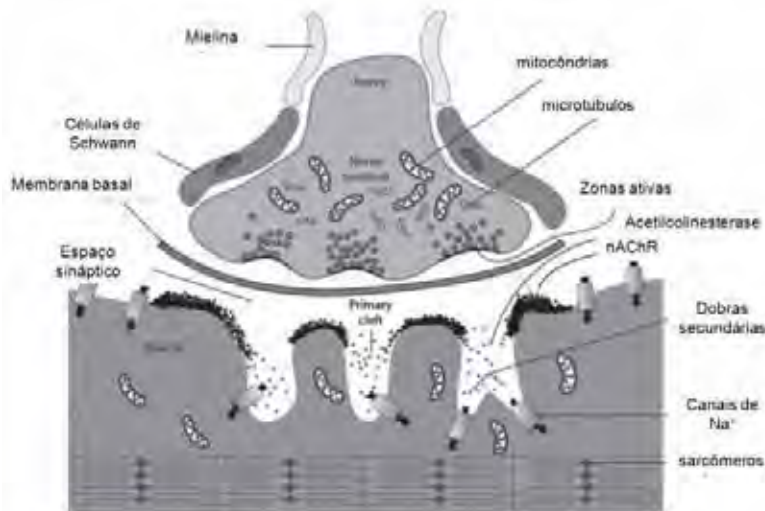


**Figura 2.** Ação da Acetilcolinesterase (AChE) sobre a Acetilcolina (ACh) na fenda sináptica.  
Fonte: Elaborado pela autora.

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcoplasma juncional e pelo sarcolema imediatamente justaposto ao terminal nervoso (Figura 1). O sarcoplasma juncional é caracterizado pela presença de mitocôndrias, REL, RER, Complexo de Golgi, estruturas lisossomais, microtúbulos, grânulos de glicogênio e pela presença de núcleos sinápticos, que são morfologicamente diferentes dos não sinápticos, pois são maiores e seus genes transcrevem proteínas encontradas apenas na membrana sarcoplasmática sináptica, sendo responsáveis pela transcrição do RNAm das subunidades dos nAChRs; (ENGEL, 2003; HALL; SANES, 1993; RUFF, 2003). O sarcolema é pregueado, contendo dobras juncionais, com cerca de 1  $\mu\text{m}$  de profundidade que aumentam a superfície pós-sináptica e, portanto a eficácia da transmissão sináptica (SANES; LITCHMAN, 1999).

Nas dobras juncionais existem duas regiões molecularmente distintas (Figura 3): o ápice, onde os nAChRs estão agrupados em uma densidade de aproximadamente  $10^4$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$  juntamente com outras proteínas como rapsina, utrofina,  $\alpha$ -distrobrevina-1 e o fundo, que contém os canais de  $\text{Na}^+$  responsáveis pela geração do potencial de ação, bem como outras proteínas:  $\alpha$ -dystrobrevina-2, distrofina e moléculas de adesão neuronal (N-CAM) (RUFF, 2003).

Os nAChRs presentes no ápice das dobras juncionais são proteínas integrais de membrana heteroligoméricas, com peso molecular de 290kDa (LINDSTROM, 2000); sua forma de rosácea (CHANGEUX; EDELSTEIN, 1998) é caracterizada por estrutura pentamérica em forma de canal iônico (Figura 4), que se abre quando a ACh liga-se a eles; sendo responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (HALL; SANES, 1993; MA et al., 2007).



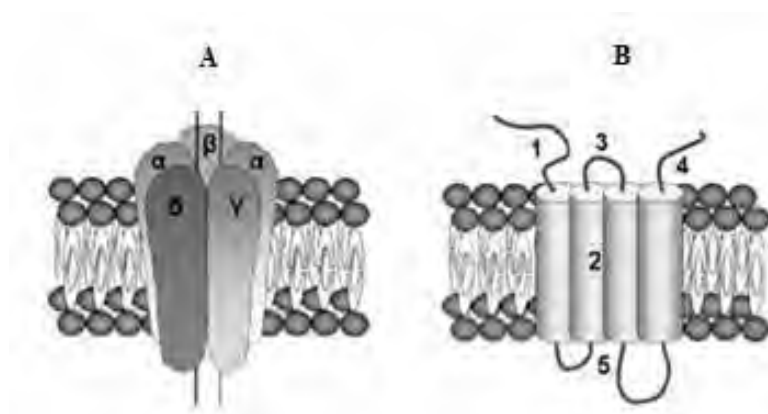
**Figura 3.** Estrutura da Junção Neuromuscular com as dobras juncionais.

Ápice (nAChR), Fundo (Canais de  $\text{Na}^+$ ).

Fonte: Adaptado de Martyn, Fagerlund e Eriksson (2009).

Com a chegada do impulso nervoso no terminal nervoso, ocorre a ativação e abertura dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  permitindo o influxo deste íon. Esse mecanismo permite a ativação de proteínas SNAREs (sinaptobrevina, SNAP-25 e syntaxina) localizadas na zona ativa do compartimento pré-sináptico, as quais estão comprometidas com a ancoragem e fusão das vesículas que contém o neurotransmissor ACh na membrana pré-sináptica (SEAGAR et al., 1999). A ACh é liberada na fenda sináptica e se liga aos canais iônicos, há entrada de  $\text{Na}^+$  e saída de  $\text{K}^+$  concomitante a abertura de canais de  $\text{Na}^+$  no fundo das dobras juncionais gerando um potencial de placa em miniatura. A somatória dos vários potenciais de placa em miniatura gera um potencial de ação maior que promove a contração muscular (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006; GALLACI; OLIVEIRA, 2007).

Existem duas formas de receptores: uma forma extrajuncional imatura, presente na fibra muscular embrionária ou na fibra desnervada, composta pelas subunidades  $\alpha 1(2)$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  ( $\gamma$ -nAChR), e a forma juncional madura, presente na JNM da fibra inervada, consistindo das subunidades  $\alpha 1(2)$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  ( $\epsilon$ -nAChR) (Figura 4A) (SHUETZE; ROLE, 1987).



**Figura 4.** Representação esquemática do nAChR. **A** – subunidades  $\alpha(2)$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . **B** – domínios presentes em cada subunidade: N-terminal hidrofílico (1), quatro segmentos hidrofóbicos transmembrana (2), domínio hidrofílico (3), C-terminal hidrofílico (4) e alças formando sítios de fosforilação (5).

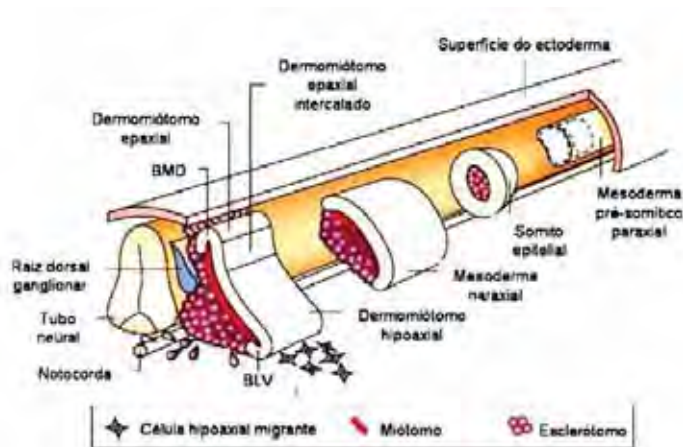
Fonte: Adaptado de Ventura et al. (2010) e Naguib et al.(2002).

Cada subunidade é constituída de um domínio extracelular N-terminal e 4 domínios transmembrânicos  $\alpha$ -hélice (M1-M4), o segundo M2 limitando a região do poro (MILLAR; HARKNESS, 2008). (Figura 4B). O sítio de ligação extracelular para a ACh ocorre na interface do domínio N-terminal das subunidades  $\alpha\delta$  e  $\alpha\epsilon$ , (PEDERSEN; COHEN, 1990; SINE, 1997). A ligação simultânea de 2 moléculas de ACh inicia a mudança conformacional dos nAChRs para a abertura do poro (GROSMAN et al., 2000). A duração do estado aberto depende da duração da ocupação de ACh neste local (ARIAS, 1997; NAGUIB et al., 2002).

## 1.2 Características do Músculo Estriado Esquelético

As fibras musculares são formadas a partir de células precursoras do mesoderma paraxial, localizadas nos somitos. Essas células adquirem identidade miogênica na porção do dermomiótomo dos somitos (Figura 5). Os somitos diferenciam-se ao longo do eixo dorso-ventral do embrião e originam o dermomiótomo na porção dorsal, que origina a derme e a musculatura esquelética dos membros e tronco. O esclerótomo na porção ventral origina a cartilagem e os ossos das vértebras e costelas (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003; BRAUN; GAUTEL, 2010).

A porção epaxial do dermomiótomo origina a musculatura profunda do dorso, a partir de células progenitoras da borda medial dorsal (BMD) que migram profundamente do dermomiótomo saem do ciclo celular, se alongam e diferenciam-se em fibras musculares (AMTHOR; CHRIST; PATEL, 1999). Um padrão similar de eventos induz a formação da borda lateral ventral (BLV) para estabelecer o dermomiótomo hipoaxial não migratório, o qual originará a musculatura lateral do tronco. Algumas células da BLV se separam do dermomiótomo e migram ventralmente para regiões de desenvolvimento dos músculos esqueléticos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma (Figura 5).



**Figura 5.** Origem embrionária do músculo estriado esquelético.

Fonte: Adaptado de Parker, Seale e Rudnicki (2003).

Durante o desenvolvimento embrionário, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica depende inicialmente de sinais positivos [Wnts, Sonic hedgehog, Noggin] ou negativos (BMP4) oriundos de tecidos circundantes, tais como a notocorda e o tubo neural (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; TSIVITSE, 2010). Esses sinais irão ativar os genes capazes de transformar células não musculares em células com um fenótipo muscular.

Entre os genes envolvidos com o processo da miogênese, destacam-se os genes membros da família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (bHLH), dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4, coletivamente chamados de fatores de regulação miogênica (do inglês, *myogenic regulatory factors* ou MRFs). Os MRFs compartilham um domínio homólogo bHLH, que é necessário para a ligação com o DNA e para a dimerização com fatores transcricionais da família da proteína E (PATAPOUTIAN et al., 1995; RAWLS et al., 1995; ZHANG; BEHRINGER; OLSON, 1995; YOON et al., 1997).

Os heterodímeros MRF-proteína E e os monômeros de MRFs ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3') conhecidas como Ebox, presentes na região promotora de vários genes músculo – específicos (MURRE et al., 1989; LASSAR et al., 1991) (Figura 6) e das subunidades dos nAChRs da junção neuromuscular (JNM) (PIETTE et al., 1990; NUMBERGER et al., 1991; SIMON; BURDEN, 1993; LIU; SPINNER; SCHMIDT, 2000).





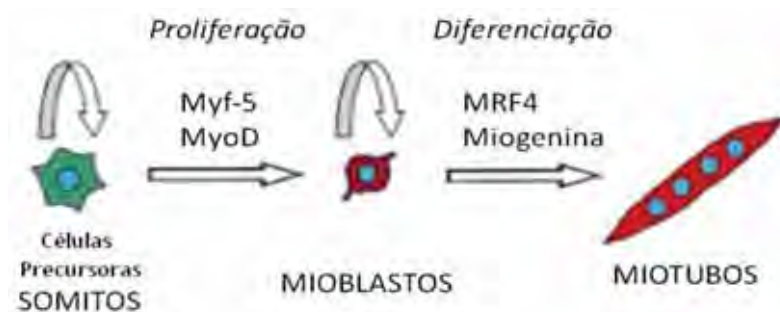
**Figura 6.** Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcricional da família “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH) MyoD e o DNA.

Fonte: Adaptado de Ma et al. (1994).

Esses fatores transcricionais são expressos no músculo durante a miogênese, crescimento, manutenção e reparo muscular, sendo essenciais durante todo o desenvolvimento do organismo.

A MyoD e Myf-5 são responsáveis pela diferenciação das células precursoras miogênicas em mioblastos e por sua proliferação (MEGENEY; RUDNICK, 1995). Já a expressão de Miogenina e MRF4 induz a diferenciação dos mioblastos em miotubos (Figura 7). (MEGENEY; RUDNICKI, 1995; ZAMMIT et al., 2006). A ausência desses fatores em animais *MyoD<sup>-/-</sup>* e *Myf5<sup>-/-</sup>* acarretam em falhas na determinação miogênica (KABLAR et al., 2003).

Os níveis de transcrito da MyoD, Miogenina e do Myf-5 diminuem durante a inervação e isto corresponde a diminuição dos RNAm dos nAChRs, enquanto MRF-4 aumenta durante o desenvolvimento acompanhado da expressão do RNAm da subunidade  $\epsilon$  (MARTINO; MERLIE, 1991). Os níveis de transcrito das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  estão correlacionados com as mudanças nos níveis do RNAm da Miogenina e não está correlacionado com os níveis de RNAm da MyoD (ENGEL, 2003; MACPHERSON; CIESLAK; GOLDMAN, 2006).

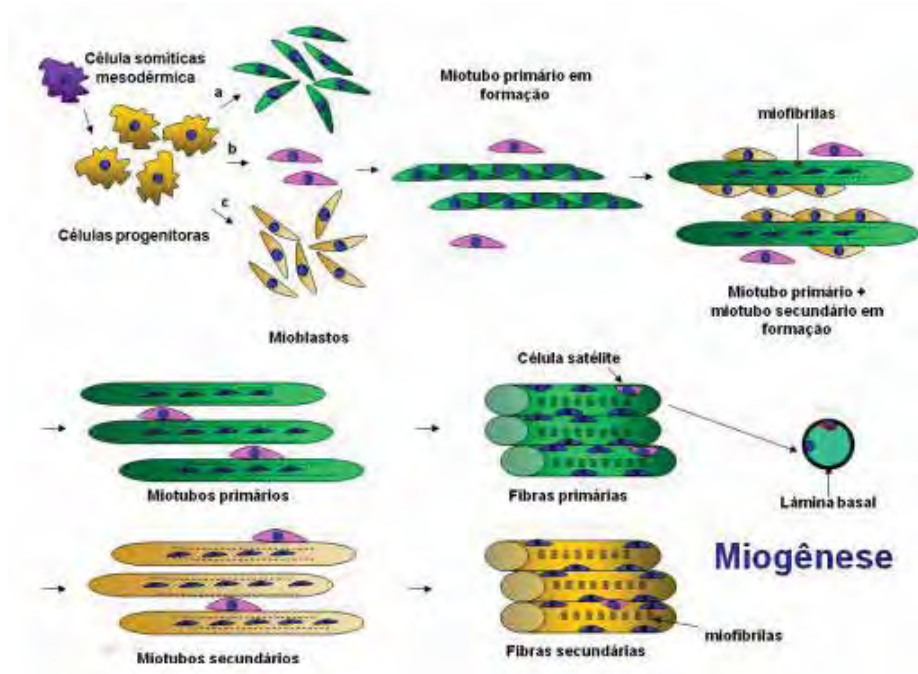


**Figura 7.** Atuação dos MRFs na linhagem de células miogênicas durante o desenvolvimento embrionário.

Fonte: Adaptado de Sabourin e Rudnicki (2000).

Embora a MyoD e o Myf5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser “pré-comprometidas” com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse “pré-comprometimento” é realizado pelo fator transcricional Pax3, da família Pax (do inglês, *paired-box*), o qual é expresso em células do mesoderma pré-somático e dos primeiros somitos epiteliais (GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994; OLGUIN et al., 2007). Já no dermomiótomo, as células precursoras, que apresentam expressão de Pax3 induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma superficial, são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação, contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica (AMTHOR; CHRIST; PATEN, 1999; OLGUIM et al., 2007).

As células precursoras originam 3 linhagens de células, denominadas de mioblastos (Figura 8). A primeira dá origem aos miotubos primários, a segunda, aos miotubos secundários, e a terceira, mioblastos que não se fundem, permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo denominados de células satélites (DAL PAI-SILVA; DAL PAI; CARVALHO, 2005).



**Figura 8.** Formação das fibras musculares estriadas.  
Fonte: Adaptado de Dal Pai-Silva, Dal Pai e Carvalho (2005).

Os miotubos primários são suporte para a formação dos miotubos secundários (ONTELL; KOZEKA, 1984). Esses miotubos primários formam fibras primárias e os miotubos secundários formam fibras secundárias, respectivamente. Os núcleos das fibras musculares migram para a periferia da célula e as miofibrilas ocupam todo o sarcoplasma. (DAL PAI-SILVA; DAL PAI; CARVALHO, 2005).

As fibras primárias originarão fibras lentas, pois expressam MHC *slow* e, as fibras secundárias originarão fibras rápidas, pois expressam MHC *fast* (STOCKDALE, 1992; KELLY; RUBINSTEN, 2003).

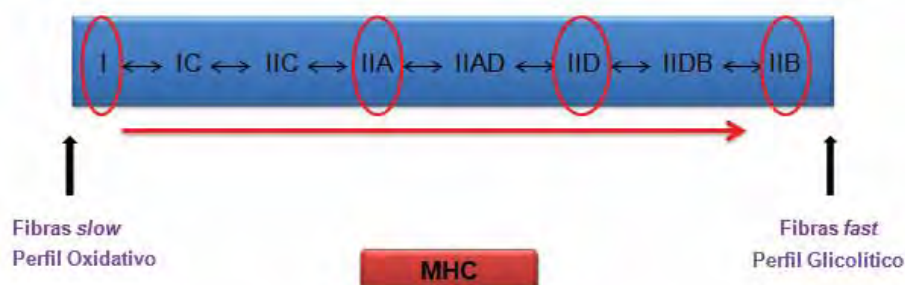
Durante a miogênese as fibras musculares que se formam inicialmente são as de perfil oxidativo (fibras primárias, *slow*) e, mais tardiamente, se desenvolvem as fibras com metabolismo glicolítico (fibras secundárias, *fast*) (ENGEL, 2003).

Nos miotubos, ocorre a organização das proteínas estruturais e contráteis que irão constituir a unidade contrátil, o sarcômero (HUXLEY, 1969). O sarcômero é constituído principalmente pelos filamentos grossos; compostos pela polimerização de 200 a 300 moléculas de miosina da classe II e filamentos finos; compostos pelas proteínas actina, troponina e tropomiosina (MASTAGLIA; DETCHANT, 1992). A contração muscular ocorre através da interação entre os filamentos finos (actina) e grossos (porção globular da molécula de miosina) do sarcômero (HUXLEY, 1969), após a hidrólise do ATP, pela ATPase miofibrilar (mATPase). (LOWEY et al., 1969). A porção globular da MHC representa o componente essencial para o mecanismo de geração de força do músculo. Segundo Talmadge e Roy (1993), a velocidade de contração é diretamente proporcional a atividade da mATPase, na porção globular da MHC.

Reiser et al. (1985) e Staron e Pette (1986), identificaram correlações entre as expressões das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC) através da técnica de eletroforese e contrações rápida e atividade da mATPase. Schiaffino et al. (1989) além de descrever um terceiro tipo de fibra no músculo *fast* com a descoberta da MHC IIx, tem classificado os tipos de fibras com base nas isoformas da MHC, sendo tipo I *slow-red*, tipo IIa *fast-red* e *fast white* dentro da categoria dos tipos IIx e IIb em roedores, enquanto IIx, mas não a IIb é expressa em humanos (SMERDU et al., 1994).

Neste contexto, Pette e Staron (2001), classificaram as fibras musculares de mamíferos em quatro tipos distintos: fibras de contração lenta (tipo I), expressando MHCI; e fibras de contração rápida (tipo II), subdivididas em tipo IIA, IID e IIB, que expressam as isoformas de MHCIIa, MHCIIc e MHCIIb, respectivamente. Os autores classificaram essas fibras como puras, uma vez que, expressavam uma única isoforma de MHC. As fibras híbridas expressam duas ou mais

isoformas de miosina, desta forma, assume-se uma organização sequencial das fibras puras (I, IIA, IID, IIB), as quais são intermediadas por fibras híbridas (IC, IIC, IIAD, IIDB) (Figura 9).



**Figura 9:** Classificação dos tipos de fibras puras e híbridas do músculo esquelético.  
Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 1 representa um resumo das nomenclaturas atualmente adotadas para os tipos de fibras, segundo Spangenburg e Booth (2003).

**Tabela 1:** Classificação dos tipos de fibra do músculo esquelético.

<i>Tipo de contração</i>	<i>Slow - lenta</i>	<i>Fast – rápida</i>	<i>Fast - rápida</i>	<i>Fast - rápida</i>
<i>Cadeia Pesada de Miosina (MHC)</i>	Tipo I	Tipo IIa	Tipo IIx	Tipo IIb
<i>Metabolismo</i>	Oxidativo	Oxidativo	Glicolítico	Glicolítico
<i>Morfologia (Coloração)</i>	Vermelho	Vermelho	Branco	Branco
<i>Diâmetro da fibra</i>	Pequeno	Médio	Grande	Grande

Fonte: Adaptado de Spangenburg e Booth (2003).

### 1.2.1 Características do Músculo Diafragma

O principal músculo da respiração é o músculo diafragma. É um músculo esquelético que atua na mecânica respiratória, cuja inervação é dada pelo nervo frênico, contendo igual quantidade de fibras motoras e sensitivas.

O diafragma é dividido em duas regiões, crural e costal, com diferenças na distribuição dos tipos de fibras e na capacidade oxidativa (SUGIURA et al., 1992).

Em ratos, utilizando-se técnicas histoquímicas, foram identificados três tipos de fibras musculares nesse músculo, com base nas características contráteis: I, IIA e IIB (GEORGE; SUSHEELA, 1961; SIECK et al., 1983; METZGER; SCHEIDT; FITTS, 1985). Bar e Pette (1988), utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), demonstraram no diafragma de ratos quatro tipos de MHCs: MHCI, MHCIIa, MHCIIb, além de um outro tipo de MHC rápida com padrão de migração eletroforética entre a MHCIIa e MHCIIb, que foi designada de MHCII<sub>d</sub> (TERMIN; STARON; PETTE, 1989; SCHIAFFINO; REGGIANI, 1994). Larsson et al. (1991), demonstrou que no músculo tibial anterior de ratos a atividade da enzima Succinato Desidrogenase (SDH) nas fibras que expressam MHCII<sub>x</sub> é idêntica a atividade dessa enzima nas fibras que expressam MHCII<sub>d</sub> evidenciada no diafragma. Portanto, alguns autores utilizam a classificação MHCII<sub>x</sub> em vez de MHCII<sub>d</sub> ou MHCII<sub>d</sub>/x (SOUSA et al., 2001; STAIB; SWOAP; POWERS, 2002; RACZ et al., 2003).

Na região costal do diafragma de ratos há maior proporção das MHCI e MHCII<sub>d</sub>/x quando comparada à região crural desse músculo, e metabolicamente a região costal possui capacidade oxidativa superior a crural (SUGIURA et al., 1992).

A presença de fibras lentas e rápidas nos músculos respiratórios refletem as suas tarefas funcionais. Enquanto a respiração tranquila usa principalmente fibras lentas, fibras musculares rápidas são recrutadas especificamente quando a taxa de respiração aumenta (POLLA et al., 2004).

Há uma mudança no recrutamento de lenta para fibras musculares rápidas durante a taquipnéia demonstrado segundo Citterio et al. (1982; 1983) no diafragma e nos músculos paraesternal de coelho. A proporção de fibras rápidas no músculo respiratório é maior em animais de laboratório pequenos como camundongos e ratos do que em seres humanos ou em mamíferos de grande porte (BLANK; CHEN; GIANNUZZO, 1988; HODGE et al., 1997).

As fibras musculares do diafragma são altamente especializadas para as suas tarefas funcionais e também são capazes de modificar suas propriedades para se adaptar às novas necessidades que possam surgir a partir das condições fisiológicas, tais como o exercício físico ou doenças respiratórias. Da mesma forma alteração nas fibras musculares do diafragma decorrente de

doenças pode prejudicar a função respiratória (POLLA et al., 2004). O diafragma é o músculo inspiratório mais importante dos mamíferos sendo muito acometido na IC.

Várias alterações morfológicas, funcionais e moleculares têm sido descritas no músculo diafragma de humanos e em modelos animais de IC, e essas alterações são mais proeminentes neste músculo quando comparadas com aquelas observadas nos músculos esqueléticos dos membros (SOUSA et al., 2001).

A disfunção diafragmática na IC é um dos fatores que alteram a frequência dos tipos de fibras, onde ocorre um aumento na frequência das fibras tipo I, de contração lenta, e diminuição na proporção de fibras do tipo II, de contração rápida (HOWELL et al., 1995). A IC induz mudança nas isoformas de MHC de contração rápida para a isoforma lenta no músculo diafragma (TIKUNOV; MANCINI; LEVINE, 1996; SOUSA et al., 2001), contrário ao que ocorre nos músculos dos membros, onde há a mudança do fenótipo do músculo para um padrão mais rápido (SIMONINI, 1996; VESCOVO et al., 1998; SOUSA et al., 2000; VESCOVO; AMBROSIO; DALLA LIBERA, 2001; BERNOCCHI et al., 2003; CARVALHO et al., 2003).

A adaptação do diafragma para um fenótipo mais lento que ocorre na IC, provavelmente é resultante do aumento da sobrecarga respiratória, e está associada com um aumento da capacidade oxidativa (HOWELL et al., 1995, TIKUNOV; MANCINI; LEVINE, 1996). O aumento no metabolismo oxidativo nos músculos respiratórios resulta do aumento da resistência à fadiga os quais são requeridos pela atividade rítmica contínua e a fadiga limita a performance física (POLLA et al., 2004). Entretanto, Sousa et al. (2001), observaram alteração na atividade mitocondrial e diminuição da capacidade oxidativa no diafragma na IC, que pode estar relacionada à maior susceptibilidade do músculo à fadiga (MANCINI et al., 1994; SUPINSKI; DIMARCO; DIBNER-DUNLAP, 1994).

Embora as causas da mudança dos tipos de fibras musculares no diafragma na IC não estejam esclarecidas, é provável que a imposição de uma sobrecarga funcional neste músculo, favoreça uma adaptação semelhante ao que ocorre nos músculos dos membros quando submetidos ao exercício de moderada intensidade (TIKUNOV; MANCINI; LEVINE, 1996).

### **1.3 Características da Insuficiência Cardíaca**

Insuficiência Cardíaca Crônica é uma síndrome multisistêmica, iniciada pela redução da função cardíaca e caracterizada pela ativação de mecanismos compensatórios, que envolve o corpo inteiro: mudanças hemodinâmicas, autonômicas e neuro-humorais que são benéficas inicialmente e tornam-se prejudiciais com o tempo (MCMURRAY; STEWART, 2000; PIEPOLI et al., 2010).

Hoje, apesar do grande desenvolvimento tecnológico e maiores recursos farmacológicos, a incidência de Insuficiência Cardíaca (IC) vem aumentando. Este aumento, em parte, decorre do envelhecimento da população, pois nos mais idosos a IC é mais freqüente (BARRETO; RAMIRES, 1998). A IC representa um importante problema clínico devido à gravidade de suas manifestações e sua prevalência.

Estima-se que existam por volta de 23 milhões de portadores em todo o mundo, com dois milhões de novos casos a cada ano (MADY, 2007). Taxas de prevalência de insuficiência cardíaca (IC) têm continuado a aumentar ao longo da primeira década do século 21 nos Estados Unidos e no mundo (LLOYD-JONES et al., 2010). 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).

No Brasil, conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a IC é a principal causa de internação do Sistema Único de Saúde a partir dos 65 anos (ARAÚJO et al., 2005). De acordo com o IBGE, a população em 2007 foi em torno de 190 milhões de habitantes, sete milhões dos quais portadores dessa síndrome (MADY, 2007).

Entre os principais sintomas clínicos da IC estão a dispnéia, a fadiga e fraqueza 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). Embora vários fatores tenham sido descritos como responsáveis pelo desenvolvimento desses sintomas, a sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida. Esse fenômeno é decorrente, em parte, da presença de alterações nos tipos de fibras musculares (LIPKIN et al., 1988; SULLIVAN; GREEN; COBB, 1990; MANCINI et al., 1992; SOUSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2003) e da mudança no seu metabolismo de oxidativo para glicolítico (VESCOVO et al., 1998) que contribuem para as limitações funcionais (VESCOVO et al., 1998; SOUSA et al., 2000). Outro fator responsabilizado pelo desenvolvimento de fadiga e fraqueza muscular na IC é a presença de atrofia da musculatura esquelética, observada em diferentes modelos animais (SIMONINI, 1996; DALLA LIBERA et al., 1999; CARVALHO et al., 2003; CARVALHO et al., 2006) e em humanos (MANCINI et al., 1992; POEHLMAN, 1999; ANKER et al., 2003).

#### **1.4 Características do Treinamento Aeróbico**

Treinamento aeróbico, conhecido como “*endurance training*” pode ser caracterizado por ser um tipo de exercício que não promove alterações na massa e na força muscular, mas aumenta a

atividade de enzimas aeróbicas (POLLA et al., 2004) que promovem modificações no músculo estriado esquelético.

Estudos histoquímicos e bioquímicos demonstraram que o treinamento aeróbio pode alterar a distribuição dos tipos de fibras e conteúdo das isoformas de MHC do músculo esquelético. (HARBER, 2002; DEMIREL et al., 1999; FITZSIMONS et al., 1990). Contudo, embora alguns trabalhos apontem um aumento no percentual de fibras do tipo I (MHCI) seguida de treinamento aeróbico, existem evidências limitadas da ocorrência de transição das fibras do tipo II para fibras do tipo I, independente do tipo de treinamento (Tabela 2).

**Tabela 2** – Representação esquemática da direção dos ajustes das fibras musculares ao treinamento aeróbico em humanos e animais. Presença de modulação (seta contínua), Ausência de modulação (seta interceptada).

	<b>TREINAMENTO AERÓBICO</b>		
<b>Humanos</b>	<b>Tipo I</b>	←-----←	<b>Tipo IIA</b>
<b>Animais</b>	←-----←	←-----←	<b>Tipo IIB</b>

Em estudos em que a área das fibras musculares diminui seguindo um protocolo de treinamento aeróbico pode ser explicada pelo aumento da atividade enzimática (POWERS et al., 1992) determinada pelo aumento do número de mitocôndrias (POLLA et al., 2004).

Existem poucas informações que avaliam mudanças estruturais nas fibras musculares em relação ao treinamento aeróbico. Muitos estudos têm procurado estudar vias de sinalização para entender melhor os mecanismos intracelulares que ocorrem no músculo durante este tipo de treinamento.

Recentes estudos tem mostrado uma melhora funcional causada por um protocolo de treinamento aeróbico durante 5 semanas em um grupo de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, esta melhora está associada a um aumento na proporção de fibras *slow* e no tamanho das fibras *fast* no músculo intercostal externo (RAMIREZ-SARMIENTO et al., 2002).

As conseqüências funcionais dessas adaptações são determinadas pelo volume de treinamento, intensidade e frequência. Além disso, muitas características da adaptação ao treinamento são específicos para o tipo de estímulo, tais como o modo de exercício realizado (COFFEY; HAWLEY, 2007).



Os estímulos específicos (perturbações mecânicas, estiramento, microlesão/injúria e estresse celular), originados de diferentes tipos e protocolos de exercício físico são transmitidos por receptores de superfície celular (moléculas transmembranas) ativando uma “cascata” de moléculas intracelulares (vias moleculares), que integram esta informação (WACKERHAGE; WOODS, 2002) e assim, controlam as mudanças quantitativas e qualitativas no músculo por meio da ativação ou repressão de genes músculo-específicos (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006) responsáveis pelas alterações das propriedades contráteis e metabólicas das fibras musculares.

O exercício físico regula as propriedades contráteis e metabólicas do músculo esquelético, e altera a expressão gênica dos MRFs (Fatores Reguladores Miogênicos), como a MyoD e Miogenina contribuem para as alterações musculares. Siu et al. (2004) demonstraram no músculo sóleo 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, porém não houve alteração da MyoD e do perfil contrátil.

### **1.5 Características do Treinamento Aeróbico na Insuficiência Cardíaca**

A intolerância ao exercício em pacientes com IC pode ser compreendida através das mudanças no músculo esquelético, como anormalidades no fluxo sanguíneo para o músculo em atividade (HAMBRECHT et al., 1998), a redução na capacidade do músculo utilizar oxigênio (MAGNUSSON et al., 1994; WILSON; MANCINI, 1993), o aumento dos níveis de citocinas próinflamatórias, o estresse oxidativo (LINKE et al., 2005) e a indução da óxido nítrico sintase (HAMBRECHT et al., 1999; MANDIC et al., 2011). Anormalidade da homeostase de  $Ca^{++}$  pela perturbação na expressão ou função das proteínas reguladoras de  $Ca^{++}$  tem sido descritas em IC severas. (HAGHIGHI et al., 2001).

Uma vez que a morbidade e mortalidade em doenças cardiovasculares são muitas vezes associadas com aumento da atividade neural simpática, o treinamento físico torna-se uma potente estratégia não farmacológica para o tratamento da IC (BRUM et al., 2011).

Algumas terapias de IC aumentam a atividade colinérgica (SERRA et al., 2009) ou diminuem a hiperatividade adrenérgica (BARTHOLOMEU et al., 2008) neste contexto, devem combinar o treinamento físico para otimizar os benefícios no sistema cardiovascular (NEGRÃO; MIDDLEKAUFF, 2008).

O treinamento aeróbio melhora a capacidade de exercício do paciente com IC e pode reverter parcialmente as anormalidades do músculo cardíaco e esquelético (LINKE et al., 2005; HAMBRECHT et al., 2000).

Alguns estudos descobriram que o treinamento aeróbio está associado com pequenas melhorias na reserva contrátil do miocárdio (HAMBRECHT et al., 1995; 2000) e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (HAMBRECHT et al., 2000).

Outros estudos têm demonstrado que o treinamento promove a redução dos volumes diastólicos e sistólicos finais e reverte parcialmente o remodelamento ventricular esquerdo anormal (GIANNUZZI et al., 2003). A melhora da função ventricular esquerda desses estudos relacionada ao exercício é mediada pela redução na resistência vascular sistêmica (HAMBRECHT et al., 1995; 2000) e à melhora na função endotelial vascular (HAMBRECHT et al., 2000; MAIORANA et al., 2000; 2011).

A toxicidade do músculo cardíaco (ROLIM et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009) e esquelético (LOPES et al., 2010; BUENO et al., 2010; BACURAU et al., 2009; PEREIRA et al., 2009) na insuficiência cardíaca é reduzida pelo exercício. É amplamente reconhecido que o treinamento aeróbio melhora a capacidade do bombeamento do coração. No entanto, os efeitos do treinamento aeróbio sobre a função cardíaca na IC ainda são controversos. Enquanto alguns estudos de Van Tol et al. (2006) não conseguiram demonstrar qualquer melhora na função cardíaca de indivíduos com IC, outros estudos demonstraram significativo aumento da contratilidade e da função cardíaca em humanos com IC (HAYKOWSKY et al., 2007).

Melhorias na função do músculo esquelético após treinamento têm sido explicadas por correções na capacidade oxidativa do músculo (MAGNUSSON et al., 1996; WILLIAMS et al., 2007; PU et al., 2001). Além disso, o treinamento físico pode levar a mais favorável redistribuição do fluxo sanguíneo levando nutrição e oxigênio para o músculo esquelético (SELIG et al., 2004; CORRA et al., 2002) e levar a uma mudança parcial das fibras musculares do tipo II para tipo I, resultando em uma melhor capacidade oxidativa (WILLIAMS et al., 2007).

Além dos efeitos sobre a função cardíaca, vascular e no músculo esquelético, o treinamento físico tem efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (LINKE et al., 2005). Diminui os níveis de citocinas e reduz o estresse oxidativo local depois do treinamento físico e diminui os danos musculares e a apoptose do músculo esquelético em pacientes com IC (LINKE et al., 2005). Além disso, mecanismos responsáveis pela melhora do pico de  $VO_2$  em pacientes com IC depois treinamento físico tem sido atribuído a mudanças favoráveis nas funções cardíacas, vasculares e do músculo esquelético que resultam na melhora do fornecimento de oxigênio e sua utilização pelo músculo (MANDIC et al., 2011).

Neste contexto, além de melhorar a função cardiovascular e muscular, o treinamento aeróbio também tem sido demonstrado ser eficaz na melhoria da qualidade de vida em pacientes com IC

(FANG et al. 2003). O treinamento físico é importante não só como tratamento da IC, mas como prevenção de doenças cardiovasculares (MEDEIROS et al., 2008).

## ***2 OBJETIVOS***



*Avaliar no músculo diafragma de ratos com Insuficiência Cardíaca submetidos ao Treinamento Aeróbico:*

- A distribuição dos nAChRs e dos terminais nervosos por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser;
- A expressão gênica das subunidades dos nAChRs e dos MRFs (Miogenina e MyoD) por PCR em Tempo Real;
- A expressão protéica das subunidades dos nAChRs e dos MRFs (Miogenina e MyoD) por Western Blot.

---

### ***3 MATERIAIS E MÉTODOS***



### 3.1 Animais e grupos experimentais

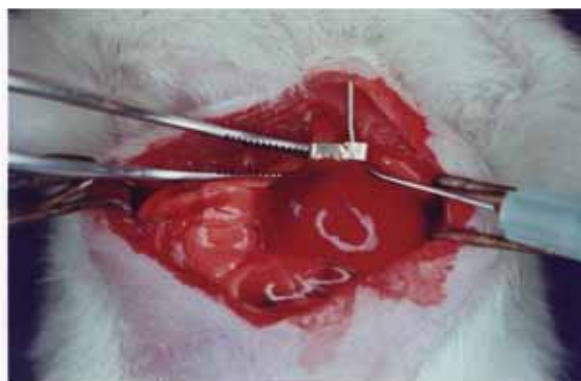
Neste estudo foram utilizados 44 ratos Wistar machos (90 a 100 g), provenientes do Biotério Central - UNESP - Campus de Botucatu - SP. Os animais foram mantidos em gaiolas (quatro animais por gaiola), no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB, em ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde recebem ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram submetidos para análise pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA, do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB, UNESP (CEEA – Protocolo 210).

Para a realização do experimento foram utilizados quatro grupos experimentais:

1. **C** (n=11): Animais Controle;
2. **TR** (n=11): Animais Treinados;
3. **EAO** (n=11): Animais com Estenose Aórtica;
4. **EAO<sub>TR</sub>** (n=11): Animais com Estenose Aórtica e Treinados.

### 3.2 Protocolo Experimental

Para a indução da estenose aórtica, os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clip de prata com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual a pressão positiva e 1 ml de soro fisiológico aquecido, intraperitonealmente. Os animais controles foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do clip (Figura 10). Dezoito semanas após a cirurgia, todos os animais com EAO, foram avaliados pelo Ecocardiograma para verificar a disfunção ventricular (PAIVA et al., 2003). Os demais animais (controle n=11 e EAO n=11) foram aleatoriamente divididos em treinados ou não treinados.



**Figura 10.** Procedimento cirúrgico para a inclusão do *clip* de prata na aorta ascendente dos animais.

### 3.3 Determinação do Limiar de Lactato

O limiar de lactato foi definido como intensidade (velocidade) de exercício associada ao aumento substancial na concentração do lactato sanguíneo durante o teste de esforço incremental (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003). O protocolo do teste intervalado e multiestágios utilizado foram adaptados de CARVALHO; MASUDA; POMPEU (2005). O teste foi iniciado com aquecimento dos ratos por 5 min a uma velocidade de 5 m/min. Após 5 min de recuperação passiva, o animal foi submetido a um esforço progressivo com velocidade inicial de 6 m/min e incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos. O protocolo foi finalizado quando o animal atingiu a exaustão, determinado quando se recusar a correr mesmo sob estimulação sonora ou quando a coordenação entre as passadas se apresentar dificultada. Entre cada aumento de carga, o animal foi retirado manualmente da esteira para coleta sanguínea (BECH et al., 1990). O teste de esforço incremental foi realizado no final da 1ª (semana de adaptação), 4ª, 7ª semanas (Tabela 3). Foi coletado sangue da cauda do animal, no repouso e entre cada aumento e carga, sendo imediatamente processado para obtenção da concentração de lactato determinado pelo método de fotometria de reflectância com uso de um lactímetro marca Roche®, Accutrend® Lactate. O equipamento foi previamente calibrado por tiras teste BM-lactate, Roche® segundo padrão indicado pelo fabricante. A determinação do limiar de lactato foi feita por meio da plotagem gráfica das concentrações de lactato versus a velocidade dos estágios. O ponto da curva onde ocorre quebra da linearidade em função do aumento da velocidade, estabelecido por inspeção visual, foi considerado o limiar de lactato (LL). A velocidade correspondente a esse ponto foi considerada como a velocidade do limiar de lactato (VLL) e o resultado foi apresentado em metros por minuto (m/min), assim como a concentração de lactato ([LAC]LL), que foi apresentado em milimoles por litro (mmol/L).



### 3.4 Protocolo de Treinamento

Os animais dos grupos TR e EAoTR foram submetidos a um programa de treinamento aeróbico (T) em esteira durante 10 semanas (5dias/semana) (Figura 11). Os animais do grupo C e EAo não receberam qualquer estímulo de treinamento. O programa de treinamento, adaptado de Souza et al. (2002) e Siu et al. (2004), conforme Tabela 3, teve início após uma semana de familiarização com o ciclo de luminosidade invertido, com a esteira e com a execução do exercício. O volume (tempo) de treinamento foi progressivo, sendo equivalente a 5 min (1ªsem - adaptação); 10, 12, 14 min (2ª a 4ª sem); 16,18 min (5ª e 6ª sem); 20 min (7ª e 8ª sem); e 22min (9ª e 10ª sem) (Tabela 3). A intensidade (velocidade) foi o VLL de cada rato. As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 14 e 16h. Ao final do experimento (28 semanas) a presença de insuficiência cardíaca foi confirmada pelo ecocardiograma e no sacrifício dos ratos, pelo encontro de derrame pleural, ascite, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito (CICOGNA et al., 1999). Foi feita uma avaliação pelo ecocardiograma, para constatar que o exercício não trouxe repercussões funcionais e morfológicas prejudiciais ao coração.

*Tabela 3* – Protocolo de Treinamento Físico.

TREINAMENTO AERÓBICO													
Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
		TESTE DE ESFORÇO				TESTE DE ESFORÇO				TESTE DE ESFORÇO			
Duração (min)	5	10	12	14	16	18	20	20	22	22			

**Fonte:** Adaptado de Sousa et al. (2002) e Siu et al. (2004)



**Figura 11.** Animais durante o treinamento aeróbico. Visão da esteira de treinamento.  
Fonte: Imagem obtida do material analisado no presente trabalho.

### 3.5 Ecocardiograma

A função ventricular foi avaliada, na 18<sup>a</sup> e 28<sup>a</sup> semanas do experimento, através do ecocardiograma (PAIVA et al., 2003). Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma com o ecocardiógrafo *Philips*<sup>®</sup> (modelo HDI-5000) equipado com transdutor eletrônico de 12,0 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, utilizamos imagens em modo-M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares (LITWIN et al., 1995). As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional foi realizado por meio da impressora UP-895MD da *Sony Co*<sup>®</sup>. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro seguindo as recomendações da *American Society of Echocardiography* em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos

consecutivos (SAHN et al., 1978). O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e do septo interventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade.

A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento endocárdico,  $\% \Delta DE$   $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$ , a porcentagem de encurtamento miocárdico,  $\% \Delta DM$   $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)\}$  e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, VEPP, que é a velocidade correspondente a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior.

No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial (onda E) e tardia conseqüente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da razão onda E/onda A. Além disso, foi medido o tempo de desaceleração da onda E (TDE) e o tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (TRIV). Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente à ponta do coração na imagem bidimensional denominada quatro câmaras, exceto para a variável TRIV que foi obtida na imagem denominada cinco câmaras. A medida dos fluxos (velocidade e tempo) foi realizada no monitor do ecocardiógrafo.

### 3.6 Parâmetros Anatômicos

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados, o músculo diafragma foi dissecado e retirado. O ventrículo esquerdo e direito também foram dissecados e pesados separadamente. As relações entre os pesos dos ventrículos esquerdos (PVE) e direito (PVD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (PVE/PC e PVD/PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia dos ventrículos.

### 3.7 Análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Para esta técnica foram utilizados 3 animais de cada grupo. Após anestesia e tricotomia, a pele na região peitoral foi dissecada e o plastrão esternal rebatido. As vísceras torácicas foram expostas e foi realizada perfusão via ventrículo esquerdo. Inicialmente o animal foi perfundido com PBS e posteriormente seguiu-se a fixação com paraformaldeído a 2%. A veia cava caudal foi seccionada junto ao átrio direito para escoamento do sangue e do excedente do líquido de perfusão.

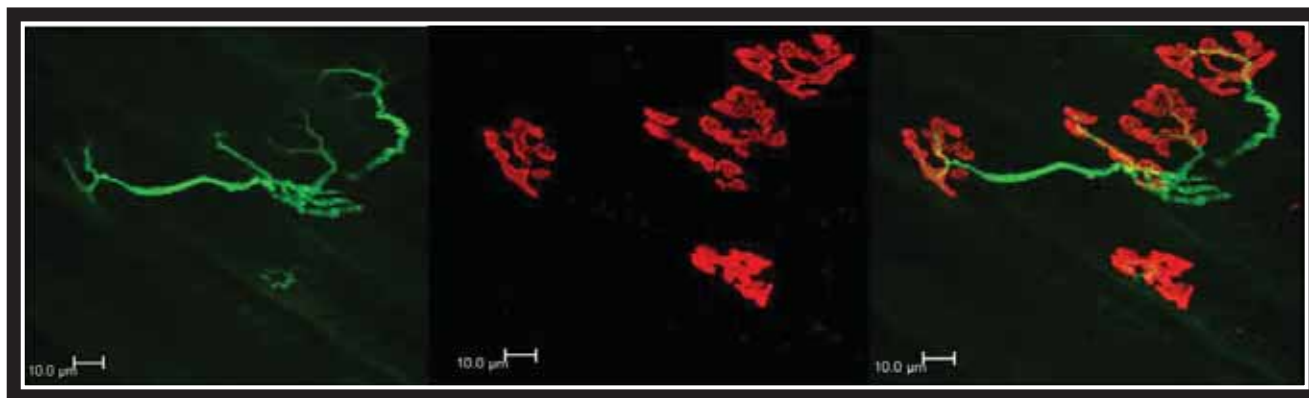
Após a perfusão vascular, o músculo diafragma foi dissecado sendo a região costal individualizada. Após visualização do ponto motor, essa região foi reduzida e seccionada longitudinalmente.

Após fixação por 15 min., fragmentos musculares foram lavados com PBS (14g de fosfato de sódio dibásico -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4,3 g de fosfato de potássio monobásico -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 72g de cloreto de sódio -  $\text{NaCl}$  e 13,6 g de fosfato de sódio monobásico -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em 1 L de água destilada, pH 7.5) três vezes de 5 min, com o objetivo de se inativar o fixador, foram incubados com glicina 0,1 M por 30 min em agitador orbital. Após lavagem com PBS foram incubados com colagenase 1% (Tipo I-Sigma C-0130) por 30 min. no agitador, para que o tecido conjuntivo que resta preso ao músculo desprenda-se. A seguir foram lavados com PBS e os nAChRs marcados com  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175, 1:1000 em PBS) durante 40 min no agitador. Após esse período, os músculos foram lavados com PBS, quatro vezes de 5 min e incubados com Triton X-100 1% (Sigma T9284) durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares.

Em seguida ficaram “overnight” em solução bloqueadora (60 $\mu$ l de triton X-100, 0,3g de soro albumina bovina 3%, 0,2g de leite m pó desnatado 2%, 3,75mg de glicina (1%), 800 $\mu$ l de soro fetal bovino 8%, diluídos em 10 ml de PBS) no agitador, com a finalidade de bloquear ou diminuir a marcação inespecífica do anticorpo primário. Após esse período foram incubados com anticorpo primário anti-neurofilamento (Anti-neurofilament 200, Sigma N-5389, 1 $\mu$ l:1ml em solução bloqueadora) a 4° C por 12 horas. No dia seguinte, foram lavados com PBS (troca a cada 20 min durante 1 hora e 30 minutos) e incubados com anticorpo secundário anti-mouse-IgG-FITC (Sigma® F-0257, 1 $\mu$ l: 1ml em solução bloqueadora) por 3 horas, à temperatura 4° C no agitador. A seguir, foram lavados novamente em PBS por 1 hora e montados em lâmina sob lamínula em meio de montagem para fluorescência VECTA SHIELD®, mounting medium for fluorescence with DAPI – Vector Laboratories, para posterior observação ao Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica®-TCS-SPE).

**OBS:** *Essa análise foi realizada no equipamento acima descrito pertencente ao Centro Integrado de Pesquisas-CIP-I-FOB/USP/Bauru/SP.*

As imagens representadas conforme Figura 12, foram obtidas pelo Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica®-TCS-SPE), analisadas pelo software *Image J* (versão 1.43u, National Institutes Health, USA) e realizado análise morfológica e morfométrica (área) dos nAChRs.



**Figura 12.** Representação do padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (nAChRs) na fibra muscular do músculo diafragma.

Fonte: Imagem obtida do material analisado no presente trabalho.

### 3.8 Avaliação da Expressão Gênica e Protéica dos nAChRs

Após eutanásia, o músculo diafragma foi rapidamente dissecado tendo seu ponto motor visualizado e conservado. A seguir a região costal foi individualizada e reduzida na região do seu ponto motor. Sendo que o antímero direito do diafragma dos animais foi utilizado para estudo da expressão gênica dos nAChRs, e o antímero esquerdo foi utilizado para expressão protéica. Os dois fragmentos rapidamente seccionados foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a  $-80^{\circ}$ .

#### 3.8.1 Expressão gênica dos nAChRs por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Para a avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR) utilizou-se os passos:

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

No momento da extração de RNA, uma porção muscular de cada amostra, previamente congelada em nitrogênio líquido, foi homogeneizada 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  $12000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . 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, homogeneizando vigorosamente e incubando novamente, desta vez, por três minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a  $12000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

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 12000 x 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 7500 x g por 5 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 água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), incubado por 30 minutos à temperatura de 4°C e, finalmente, armazenado a -80°C. O RNA foi quantificado por uma absorbância de 260 nm usando espectrofotômetro NanoVue (GE healthcare, USA), com fator de correção próprio para o RNA (40). Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a A260/A280 e A260/A230nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas, aceitável quando ambas razões foram > 1,8), o que nos fornecerá uma estimativa da qualidade da extração.

#### *b) Gel analítico de RNA*

A qualidade (integridade) do RNA foi avaliada pelo *software Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Germany) obtendo um número de integridade do RNA (RIN) > 8 e presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S bem delimitadas.

#### *c) Tratamento do RNA com DNase*

Conforme as instruções do protocolo *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 2 µg do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foi acrescentado 2 µL de tampão de DNase (10X), 2 µL de DNase I Amp Grade (1 U/µL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I.

#### *d) Reação de Transcrição Reversa (RT)*

A reação de Transcrição Reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), onde 2 µg do RNA total tratado com DNase (22 µL de solução) foram acrescidos de 10 µL de tampão de transcriptase reversa (10X RT

buffer), 4  $\mu\text{L}$  de dNTPs (25X), 10  $\mu\text{L}$  de Random Primers (10X), 5  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptase reversa MultiScribe RT (50 unidades/ $\mu\text{l}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100  $\mu\text{L}$  com água ultrapura livre de RNase. Cada amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, e então a 42°C por 2 horas. Os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

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

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 2  $\mu\text{L}$  do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5  $\mu\text{L}$  de *Power SYBR® Green Mix* (2,5X), primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água-DEPC suficiente para um volume final de 25  $\mu\text{L}$  de solução. Os primers para os genes analisados (Tabela 4) foram desenhados através do software *Primer Express®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de seqüências publicadas no GenBank ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), e sintetizados pela *Invitrogen Life Technologies* (Carlsbad, CA, EUA).

As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Ao término de todos os PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Os valores obtidos na PCR em Tempo Real, para os genes alvo, foram normalizados pelos valores obtidos pelo gene de referência. Este foi previamente testado quanto à sua variação na expressão entre os grupos estudados. Foram testados os genes de referência que estão representados na Tabela 4: Beta cytoskeletal actin (ACTB), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), TATA box binding protein (TBP), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Ciclophilin A (CypA) frequentemente utilizados na análise da expressão gênica em músculo de ratos (VANDESOMPELE et al., 2002). Os resultados foram normalizados através do *Data Assist software* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

**Tabela 4:** Genes que foram analisados pela reação de *qRT-PCR* em Tempo Real.

Gene	No. Acesso.	Seqüência do primer (5' – 3')
<i>Gamma</i>	NM_019145	F:CCACCAGAAGGTGGTGTCT R:TGAGGAGATGAGCACACAGG
<i>Alpha 1</i>	NM_024485	F:TCCCTTCGATGAGCAGAACT R:AGCCGTCATAGGTCCAAGTG
<i>Epsilon</i>	NM_017194	F:GGCTCAACTTCAGCAAGGAC R:AGCCATACATGTTCGGAAGG
<i>Beta 1</i>	NM_012528. 1	F:CATCGAGTCTCTCCGTGTCA R:GGCAACGTCAAAGTTTCCAT
<i>Delta</i>	NM_019298. 1	F:ACCACCAAGACGTCACCTTC R:CCGAGGTCTTCTCTCCACAG
<i>MyoD</i>	NM_176079.1	F:TTTTTCATGCGACTCACAGC R:GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG
<i>Myogenin</i>	M24393	F:TGCCACAAGCCAGACTACCCACC R:CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA
<i>TBP</i>	NM_001004198.1	F:GCCACGAACAACCTGCGTTGAT R:AGCCCAGCTTCTGCACAACCTTA
<i>ACTB</i>	NM_031144	F:TCAGGTCATCACTATCGGCAATG R:TTTCATGGATGCCACAGGATTC
<i>HPRT</i>	NM_012583	F:CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R:GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
<i>GAPDH</i>	NM_017008.3	F:CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA R:GGCATGGACTGTGGTCATGA
<i>Cyclophilin A</i>	NM_017101.1	F:TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R:CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC

F: primer senso; R: primer anti-senso e; pb: pares de bases

**Fonte:** do Autor

### 3.8.2 Expressão protéica dos nAChRs por Western Blot

#### a) Extração de proteínas

As amostras do músculo diafragma congelado de todos os grupos foram homogeneizadas em Polytron com 500µL de tampão de lise. Esse tampão foi constituído por Fluoreto de sódio (100mM), Pirofosfato de sódio (10mM), Ortovanato de sódio (10mM), Trisma Base pH 7,5 (100mM), ácido



etilenodiamino tetra-acético-EDTA (10mM), fluoreto de fenilmetano sulfonila-PMSF (2mM) diluído em álcool etílico, aprotinina 0,1mg/ml e água deionizada.

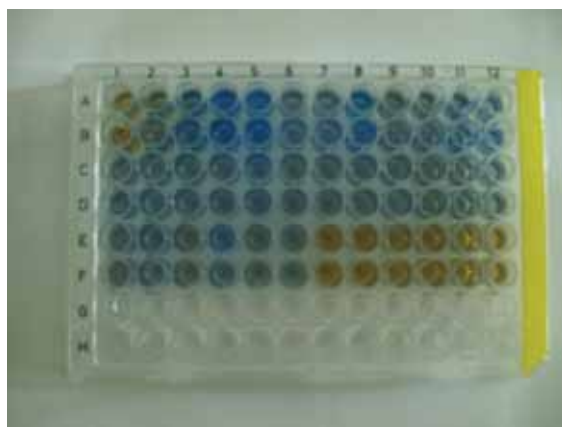
Após a sonificação foi adicionado 10% do volume adicionado de tampão de lise de Triton (10%) em cada amostra durante 30 minutos. Em seguida, os homogeneizados foram transferidos para eppendorfs previamente identificados e centrifugados a 11.000 rpm, por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80°C.

#### *b) Tratamento com Laemmli*

As amostras foram tratadas com Laemmli correspondente a 50% do sobrenadante utilizado. Em seguida as amostras com Laemmli foram levadas a banho seco de 95-100°C por 5 minutos. Após tratamento foram estocadas novamente em freezer -80°C.

#### *c) Quantificação de proteínas*

Para saber a quantidade total de proteínas em cada amostra, foi realizada a quantificação de proteínas pelo Método de Bradford em placa de Elisa (Figura 13), utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA 0,1%) como proteína da curva padrão.



**Figura 13.** Placa de Elisa no método de quantificação Bradford.  
Fonte: Imagem obtida do material analisado no presente trabalho.

Após leitura em espectrofotômetro, foi possível ajustar as proteínas das amostras para 50µg/µl e dessa forma aplicar essa concentração no gel.

#### d) Preparação do gel para eletroforese

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel 12%. O gel foi constituído por água, Tampão Resolving (SDS 2%) e Stacking (SDS 2%), Acrilamida 40%, Temed e Persulfato de Amônio (APS 10%). O Temed e APS atuam como catalizadores da reação, dessa maneira são os últimos componentes a serem adicionados. Depois de realizada a solução do gel, este foi imediatamente colocado no suporte de vidro com espessura de 1,5mm para o gel e pente de 15 *well* (sistema BioRad) para que fosse polimerizado. Após polimerização do gel, as amostras com 50µg de proteína foram aplicadas no gel em cada *well* para separação por eletroforese (SDS-PAGE), dentro de uma cuba eletrolítica. Foi adicionado 5µl de um marcador *PageRuler*<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder, Fermentas®, que determinou o peso das proteínas em kDa. O peso molecular para a subunidade  $\gamma$ -nAChR (58 kDa),  $\alpha 1$ -nAChR (55 kDa),  $\epsilon$ -nAChR (44-60 kDa), Myogenin (36 kDa), MyoD (38 kDa) e  $\beta$ -actina (43kDa) foi encontrado conforme especificações do *Datasheet* do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California).

#### e) Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose

Em seguida foi montado sistema para transferência das proteínas do gel para uma *membrana de nitrocelulose Hybond ECL* (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). O gel ficou face a face com a membrana, e uma corrente elétrica foi aplicada entre grandes placas. Esse mecanismo transferiu a proteína exatamente na posição original que estava no gel.

#### f) Bloqueio, incubação com anticorpos e revelação

As membranas foram bloqueadas no sistema SNAPid MILIPORE<sup>®</sup> com BSA 3% por 10 min, depois incubadas com o anticorpo primário de acordo com as especificações do fabricante. Após esta incubação foram lavadas 4X com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugados com *horseradich peroxidase* (HRP) por 10 minutos. Após esta incubação foi lavado 4X novamente para retirar o excesso de anticorpo secundário e revelado com DAB (SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>, D5637). A quantificação foi feita por densitometria, por meio da utilização do programa *Image J* (versão 1.43u, National Institutes Health, USA) *software*. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína  $\beta$ -Actina.

## ***4 REFERÊNCIAS***



- AMTHOR, H.; CHRIST, B.; PATEL, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. **Development**, Vol. 126, p. 1041-1053, 1999.
- ANKER, S. D. et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. **Lancet**, Vol. 9363, no. 361, p. 1077-1083, 2003.
- ARAUJO, D. V. et al. Custo da insuficiência cardíaca no Sistema Único de Saúde. **Arq. Bras. Cardiol.** Vol. 84, no. 5, p. 422-427, 2005.
- ARIAS, H. R. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. **Brain Res Brain Res Rev**, Vol. 25, no. 2, p. 133-191, 1997.
- BACURAU, A.V. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **Journal Appl. Physiol**, Vol. 106, p. 1631-1640, 2009.
- BAR, A.; PETTE, D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. **FEBS Lett**, Vol. 235, no. 1-2, p. 153-5, Aug, 1988.
- BARRETTO, A. C. P.; RAMIRES. J. A. F. Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Vol. 71, no. 4, p. 635-642, 1998.
- BARTHOLOMEU, J.B. et al. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. **Journal Mol Cell Cardiol**, Vol. 45, p. 240-249, 2008.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**, Vol. 75, p.19-37, 2006.
- BECH, O. et al. Effects of long-term coenzyme Q10 and captopril treatment on survival and functional capacity in rats with experimentally induced heart infarction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Vol. 255, no. 1, p. 346, 1990.
- BERNOCCHI P. et al. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. **Basic Res. Cardiol**, Vol. 98, p. 114- 123, 2003.
- BIGARD, A. X. et al. 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**, Vol. 11, no. 30, p. 2391-401, 1998.
- BLANK, S.; CHEN, V.; GIANNUZZO, C. Biochemical characteristics of mammalian diaphragms. **Respir Physiol**, Vol. 74, p. 115-26, 1988.
- BOOJ, S. et al. Axonal transport of synapsin I and cholinergic synaptic vesicle-like material; further immunohistochemical evidence for transport axonal cholinergic transmitter vesicles in motor neurons. **Acta Physiologica Scandinavica**, Vol. 128, p. 155-65, 1986.

- BRAUN, T.; GAUTEL, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Vol. 6, no. 12, p. 349-61, 2010.
- BRUM, P. C. et al. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Vol. 44, no. 9, p. 827-835, 2011.
- BUENO, C.R. et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca<sup>2+</sup> handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J Appl Physiol**, Vol. 109, p. 702-709, 2010.
- CARVALHO, R. F. et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **Int J Exp Pathol**, Vol. 4, no. 84, p. 201-6, 2003.
- CARVALHO, J.F.; MASUDA, M.O.; POMPEU F, A. M. S. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comp Biochem Physiol**, Vol. 140, p. 409-13, 2005.
- CARVALHO, R. F. et al. Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. **Int J Exp Pathol**, Vol. 87, no. 3, p. 219-225, 2006.
- CHANGEUX, J. P.; EDELSTEIN, S. J. Allosteric receptors after 30 years review. **Neuron**, Vol. 21, p. 959-980, 1998.
- CHARGÉ, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev.**, Vol. 84, no.1, p. 209-238, 2004.
- CICOGNA, A. et al. Direct effects of colchicine on myocardial function studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, p. 60-65, 1999.
- CITTERIO, G. et al. Selective activation of parasternal muscle fibers according to breathing rate. **Respir Physiol**, Vol. 48, no. 2, p. 281-95, May.1982.
- CITTERIO, G. et al. Slow to fast shift in inspiratory muscle fibers during heat tachypnea. **Respir Physiol**, Vol. 51, no. 2, p. 2, p. 259-74, Feb. 1983.
- COFFEY, V. G., HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med**, Vol. 37, no. 9, p. 737-63, 2007.
- CORRA, U. et al. Chronic heart failure- related myopathy and exercise training: a developing therapy for heart failure symptoms. **Prog Cardiovasc Dis**, Vol. 45, p.157-72, 2002.
- COWIE, M. R. et al. The epidemiology of heart failure. **Eur Heart J**, Vol. 2, no. 18, p. 208-25, 1997.
- DAL PAI-SILVA, M.; DAL PAI, V.; CARVALHO, R. F. Célula muscular estriada esquelética. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. (Eds.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Editora Manole, 2005. p. 83-94.

DALLA LIBERA, L. et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. **Am J Physiol**, Vol. 5, no. 277, p. 982-6, 1999.

DEMIREL, H. A. et al. Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship. **Am Physiol Soc**, Vol. 86, p.1002-1008, 1999.

ENGEL, A. G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology** – basic and clinical. 3.ed. New York: International Edition, 2003. p. 325-372. Vol.1.

FANG, J. et al. Exercise, body mass index, caloric intake, and cardiovascular mortality. **Am J Prev Med**. Vol. 25, p. 283–289, 2003.

FITZSIMONS, D.P. et al. Effects of endurance exercise on isomyosin patterns in fast- and slow-twitch skeletal muscles. **J Appl Physiol**, Vol. 68, p. 1950-1955, 1990.

GALLACI, M.; OLIVEIRA, A. C. Farmacologia da junção neuromuscular. In: **Farmacologia integrada**. 3. ed. 2007. p. 175-183. Cap. 20.

GEORGE, J; SUSHEELA, A. A histophysiological study of the rat diaphragm. **Biol.Bull**, Vol. 121, p. 471-480, 1961.

GIANNUZZI, P. et al. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in left ventricular dysfunction and chronic heart failure (ELVD-CHF) trial. **Circulation**, Vol. 108, p. 554–559, 2003.

GOULDING, M.; LUMSDEN, A.; PAQUETTE, A. J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. **Development**, Vol. 4, no. 140, p. 957-971, 1994.

GROSMAN, C. et al. The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. **J Gen Physiol**, Vol. 116, p. 327–40, 2000.

HAGHIGHI, K. et al. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. **J Biol Chem**, Vol. 276, p. 24145-24152, 2001.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, Vol. 72, p. 99–121, 1993.

HAMBRECHT, R. et al. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. **J Am Coll Cardiol**, Vol. 25, p.1239–49, 1995.

HAMBRECHT, R. et al. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Vol. 8, p. 2709–15, 1998.

HAMBRECHT, R. et al. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle. **J Am Coll Cardiol**, Vol. 33, p. 174–9, 1999.

- HAMBRECHT, R. et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: a randomized trial. **JAMA**, Vol. 283, p. 3095–101, 2000.
- HARBER, M. P. Myosin heavy chain composition of single muscle fibers in male distance runners. **Int J Sports Med**, Vol. 23, p. 484–488, 2002.
- HAYKOWSKY, M. J. et al. A metaanalysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed. **J Am Coll Cardiol**, Vol. 49, p. 2329-2336, 2007.
- HODGE, K. et al. Bioenergetic characteristics of the costal and crural diaphragm in mammals. **Respir Physiol**, Vol. 109, p. 149–54, 1997.
- HOWELL, S. et al. Congestive heart failure: differential adaptation of the diaphragm and latissimus dorsi. **J Appl Physiol**, Vol. 79, no. 2, p. 389–97, 1995.
- HUGHES, B. W.; KUSNER, L. L.; KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, Vol. 33, no. 4, p. 445-61, 2006.
- HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, Vol. 164, p. 1356-1365, 1969.
- KABLAR, B. et al. My-f5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. **Dev Biol**, Vol. 2, no. 258, p. 307-18, 2003.
- KANG, J. R.; ZAMORANO, D. P.; GUPTA, R. Limb salvage with major nerve injury: current management and future directions. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, Vol. 19, Suppl. 1, S28-34, 2011.
- KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N. A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: **Myology**. 3. ed. 2003. Vol.1, p. 87-103.
- KOIRALA, S.; REDDY, L. V.; KO, C. P. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. **J. Neurocytol**, Vol.32, p. 987-1002, 2003.
- LARSSON, L. et al. MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. **Am. J. Physiol**, Vol.261, p. C93-C101, 1991.
- LASSAR, A. B. et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E-47- like proteins in vivo. **Cell**, Vol. 66, p. 305-315, 1991.
- LINDSTROM, J. M. Acetylcholine receptors and myasthenia. **Muscle Nerve**, Vol. 23, no. 4, p. 453-77, 2000.
- LINKE, A. et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. **Circulation**, Vol. 111, p. 1763–70, 2005.
- LIPKIN, D. P. et al. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **Int J Cardiol**, Vol. 2, no. 18, p. 187-95, 1988.

LITWIN, S. E. et al. Serial echocardiographic-doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, Vol. 91, no. 10, p. 2642–2654, 1995.

LIU, S.; SPINNER, D. S.; SCHMIDT, M. M. Interaction of MyoD family proteins with enhancers of AChR subunit genes in vivo. **J. Biol Chem**, Vol. 275, p. 41364–41368, 2000.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, Vol. 121, p. 948–54, 2010.

LOPES, R.D. et al. Changes in the production of IL-10 and TNF- $\alpha$  in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol**, Vol. 94, p. 293–320, 2010.

LOWEY, S. et al. Substructure of the myosin molecule: I. subfragments of myosin by enzymic degradation. **J Mol Biol**, Vol. 42, no. 1, p. 1–29, May. 1969.

MA, P. C. et al. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. **Cell**, Vol. 3, no. 77, p. 451–459, 1994.

MA, J. et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. **J. Orthop. Res**, Vol. 25, no. 11, p. 1498–1505, 2007.

MACPHERSON, P. C.; CIESLAK, D.; GOLDMAN, D. Myogenin-dependent nAChR clustering in aneural myotubes. **Mol Cell Neurosci**, Vol. 4, no. 31, p. 649–60, 2006.

MADY, C. Current situation of the treatment of heart failure in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, Vol. 4, no. 89, p. 84–86, 2007.

MAGNUSSON, G. et al. Skeletal muscle strength and endurance in chronic congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, Vol. 73, p. 307–9, 1994.

MAGNUSSON, G. et al. High intensity knee extensor training, in patients with chronic heart failure. Major skeletal muscle improvement. **Eur Heart J**, Vol. 17, p. 1048–55, 1996.

MAIORANA, A. J. et al. Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Vol. 279, p. H1999–2005, 2000.

MAIORANA, A. J. et al. The impact of exercise training on conduit artery wall thickness and remodeling in chronic heart failure patients. **Hypertension**, Vol. 57, p. 56–62, 2011.

MANCINI, D. M. et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation**, Vol. 4, no. 85, p. 1364–73, 1992.

MANCINI, D. M. et al. Evidence of reduced respiratory muscle endurance in patients with heart failure. **J Am Coll Cardiol**, Vol. 24, no. 4, p. 972–81, 1994.



- MANDIC, S. et al. Resistance versus aerobic exercise training in chronic heart failure. **Current Heart Failure Reports**, 2011. (Epub ahead of print).
- MARTINO, J. C.; MERLIE, J. P. Nerve-dependent modulation of acetylcholine receptor epsilon - subunit gene expression. **J. Neurosci**, Vol. 11, p. 1291–99, 1991.
- MARTYN, J. J.; FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Basic principles of neuromuscular transmission. **Anaesthesia**, Vol. 64, p. 1-9, 2009.
- MASTAGLIA, L. F; DETCHANT, L. W. **Skeletal muscle pathology**. 2. ed. Chuechill Livingstone, 1992.
- MCMURRAY, J. J.; STEWART, S. Epidemiology, etiology, and prognosis of heart failure. **Heart**, Vol. 83, p. 596–602, 2000.
- MEDEIROS, A. et al. Effect of exercise training and carvedilol treatment on cardiac function and structure in mice with sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **Braz J Med Biol Res**, Vol. 41, p. 812-817, 2008.
- MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem Cell Biol**, Vol.73, no. 9-10, p. 723-732, 1995.
- METZGER, J. M.; SCHEIDT, K. B.; FITTS, R. H. Histochemical and physiological characteristics of the rat diaphragm. **J. Appl. Physiol**, Vol. 58, p.1085-1091, 1985.
- MILLAR, N. S.; HARKNESS, P. C. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular Membrane Biology**, Vol. 4, no. 25, p. 279-292, 2008.
- MURRE, C. et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, Vol. 58, no. 3, p. 537-544, 1989.
- NAGUIB, M. et al. Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. **Anesthesiology**, Vol. 96, no. 1, p. 202-31, 2002.
- NEGRÃO, C. E.; MIDDLEKAUFF, H. R. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control. **J Appl Physiol**, Vol. 104, p. 577-578, 2008.
- NUMBERGER, M. et al. Different mechanisms regulate muscle – specific AchR gamma- and epsilon- subunit gene expression. **EMBO J**, Vol. 10, p. 2957-2964, 1991.
- OLGUIN, H. C. et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. **J Cell Biol**, Vol. 177, p. 69-79, 2007.
- OLIVEIRA, R. S. et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. **J Physiol**, Vol. 587, p. 3899-3910, 2009.
- ONTELL, M.; KOZEKA, K. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. **Am J Anat**, Vol. 171, no. 2, p. 133-148, 1984.

- PAIVA, S. A. R. de. et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. **Am J Physiol Heart Circ. Physiol.**, Vol. 284, p. H2242-2246, Jun. 2003.
- PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nat Rev Genet**, Vol. 4, no. 7, p. 497-507, 2003.
- PATAPOUTIAN, A. et al. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. **Development**, Vol. 10, no. 121, p. 3347-3358, 1995.
- PATTON, B. L. et al. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 139, no. 6, p. 1507-1521, 1997.
- PATTON, B. L. Basal lamina and organization of neuromuscular synapses. **Journal of Neurocytology**, Vol. 32, p. 883-903, 2003.
- PEDERSEN, S. E.; COHEN, J. B. d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. **Proc Natl Acad Sci**, Vol. 87, p. 2785-9, 1990.
- PEREIRA, M.G. et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. **Eur J Appl Physiol**, Vol. 105, p. 843-850, 2009.
- PETTE, D.; STARON, R.S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochem Cell Boil**, Vol. 115, p. 359-372, 2001.
- PIEPOLI, M. F. et al. Exercise intolerance in chronic heart failure: mechanisms and therapies. Part I. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, Vol. 17, p. 637-642, 2010.
- PIETTE, J. et al. Two adjacent MyoD1 – binding sites regulate expression of the AchR alpha – subunit gene. **Nature**, Vol. 345, p. 353-355, 1990.
- POEHLMAN, E. T. Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. **J Nutr**, Vol. 129, 1S Suppl., p. 260-263, 1999.
- POLLA, B. et al. Respiratory muscle fibres: specialization and plasticity. **Thorax**, Vol. 59, no. 9, p. 808-17, 2004.
- POOLE-WILSON, P. A.; FERRARI, R. Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, Vol. 11, no. 28, p. 2275-85, 1996.
- POWERS, S. K. et al. Exercise-induced cellular alterations in the diaphragm. **Am J Physiol**, Vol. 263, p. R1093-8, Nov., 1992.
- PU, C.T. et al. Randomized trial of progressive resistance training to counteract the myopathy of chronic heart failure. **J Appl Physiol**, Vol. 90, p. 2341-50, 2001.

- RACZ, G. Z. et al. Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, Vol. 168, p. 297–304, 2003.
- RAMIREZ-SARMIENTO, A. et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. **Am J Respir Crit Care Med**, Vol.166, no. 11, p. 1491-7, 2002.
- RAWLS, A. et al. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. **Dev Biol**, Vol. 1, no. 172, p. 37-50, 1995.
- REISER, P.J. et al. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. **J Biol Chem**, Vol. 260, p. 9097-9080, 1985.
- ROLIM, N. P. et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. **Physiol Genomics**, Vol. 29, p. 246-252, 2007.
- RUFF, R. L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. **Ann N Y Acad Sci**, Vol. 998, p. 1-10, 2003.
- SABOURIN, L. A.; RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin Genet**, Vol. 57, p. 16–25, 2000.
- SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, Vol. 58, no. 6, p. 1072-1083, Dec. 1978.
- SANES, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 278, no. 15, p. 12601-12604, 2003.
- SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annual Review of Neuroscience**, Vol. 22, p. 389-442, 1999.
- SCHIAFFINO, S. et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. **Muscle Res Cell Motil**. Vol. 10, no. 3, p. 197-205, Jun. 1989.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **J Appl Physiol**, Vol. 77, p. 493-501, 1994.
- SCHUETZE, S. M.; ROLE, L. W. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors. **Annu Rev Neurosci**, Vol. 10, p. 403, 1987.
- SEAGAR, M. et al. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. **Phil Trans R Soc Lond B**, Vol. 354, p. 289 –297, 1999.
- SELIG, S. E. et al. Moderate-intensity resistance exercise training in patients with chronic heart failure improves strength, endurance, heart rate variability, and forearm blood flow. **J Card Fail**, Vol. 10, p. 21–30, 2004.
- SERRA, S. M. et al. Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. **J Card Fail**, Vol. 15, p. 124-129, 2009.

- SIECK, G. C. et al. Muscle fiber type distribution and architecture of the cat diaphragm. **J Appl Physiol**, Vol. 55, no. 5, p. 1386-92, Nov. 1983.
- SIMON, A. M.; BURDEN, S. J. An Ebox mediates activation and repression of the acetylcholine receptor delta – subunit gene during myogenesis. **Mol Cell Biol**, Vol. 9, no. 13, p. 5133-40, 1993.
- SIMONINI, A. Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, Vol. 8, no. 28, p. 1683-91, 1996.
- SINE, S. M. Identification of equivalent residues in the gamma, delta, and epsilon subunits of the nicotinic receptor that contribute to alpha- bungarotoxin binding. **J Biol Chem**, Vol. 272, p.23521–23527, 1997.
- SIU, P. M. et al. Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. **Journal of Applied Physiology**, Vol. 97, no. 1, p. 277-285, Jul. 2004.
- SOUSA, E. et al. Heart failure effects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. **Circulation**, Vol. 15, no. 102, p. 1847-53, 2000.
- SOUSA, E. et al. Dual influence of disease and increased load on diaphragm muscle in heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, Vol. 33, no.4, p. 699-710, 2001.
- SOUSA, E. et al. Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. **Cardiovascular Research**, Vol. 56, p. 260-268, Jun. 2002.
- SLATER, C. R. The basal lamina and stability of the mammalian neuromuscular junction. **Progress in Brain Research**, Vol. 84, p. 73-81, 1990.
- SMERDU, V. et al. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIB fibers of human skeletal muscle. **Am J Physiol**, Vol. 267, p. C1723-C1728, 1994.
- SPANGENBURG, E. E.; BOOTH, F. W. Molecular regulation of individual skeletal muscle fiber types. **Acta physiologica Scandinavica**, Vol. 178, no. 4, p. 413-24, 2003.
- STAIB, J. L.; SWOAP, S. J.; POWERS, S. K. Diaphragm contractile dysfunction in MyoD gene inactivated mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, Vol. 283, p. R583–R590, 2002.
- STARON, R. S.; PETTE, D. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. **Histochemistry**, Vol. 86, no. 1, p. 19-23, 1986.
- STOCKDALE, F. E. Myogenic cell lineages. **Dev Biol**, Vol.154, p. 284 -298, 1992.
- SUGIURA, T. et al. Regional differences in myosin heavy chain isoforms and enzyme activities of the rat diaphragm. **Journal of applied physiology**, Vol. 73, no. 2, p. 506-9, 1992.
- SULLIVAN, M. J.; GREEN, H. J.; COBB, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, Vol. 81, no. 2, p. 518–527, 1990.

SUPINSKI, G.; DIMARCO, A.; DIBNER-DUNLAP, M. Alterations in diaphragm strength and fatigability in congestive heart failure. **J Appl Physiol.**, Vol. 76, no. 6, p. 2707-13, Jun. 1994.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Vol. 28, no. 2, p. 299-323, Apr. 2003.

TALMADGE, R.J.; ROY, R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **J Appl Physiol**, Vol. 75, p. 2337-2340, 1993.

TERMIN, A.; STARON, R. S.; PETTE, D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. **Histochemistry**, Vol. 92, no. 6, p. 453-457, 1989.

TIKUNOV, B. A.; MANCINI, D.; LEVINE, S. Changes in myo- fibrillar protein composition of human diaphragm elicited by congestive heart failure. **J. Mol. Cell. Cardiol**, Vol. 28, p. 2537–2541, 1996.

TSIVITSE, S. Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. **Int J Biol Sci**, Vol. 3, no. 6, p. 268-81, 2010.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, Vol. 3, no. 7, 2002.

VAN TOL, B. A. et al. Effects of exercise training on cardiac performance, exercise capacity and quality of life in patients with heart failure: a meta-analysis. **Eur J Heart Fail**, Vol. 8, p. 841-850, 2006.

VENTURA, A. L. M. et al. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Rev Psiq Clín**, Vol. 37, no. 2, p. 66-72, 2010.

VESCOVO, G.; AMBROSIO, C. B.; DALLA LIBERA, L. Apoptosis and changes in contractile protein pattern in the skeletal muscle in heart failure. **Acta Physiologica Scandinavica**, Vol. 171, no. 3, p. 305-310, Mar. 2001.

VESCOVO, G. et al. 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**, Vol. 1, no. 39, p. 233-41, 1998.

WACKERHAGE, H.; WOODS, N. M. Exercise-induced signal transduction and gene regulation in skeletal muscle. **J Sports Sci Med**, Vol. 1, p. 103-114, 2002.

WHITTAKER, V. B. The structure and function of cholinergic synaptic vesicles. **Biochem. Soc. Trans**, Vol. 12, p. 561, 1984.

WILLIAMS, A. D. et al. Circuit resistance training in chronic heart failure improves skeletal muscle mitochondrial ATP production rate--a randomized controlled trial. **Journal of Cardiac failure**, Vol. 13, no. 2, p. 79-85, Mar. 2007.

WILLIAMS, B. A.; ORDAHL, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. **Development**, Vol. 120, no. 4, p. 785-796, 1994.

WILLMANN, R.; FUHRER, C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. **Cell. Mol. Life. Sci.**, Vol. 59, no. 8, p. 1296- 1316, 2002.

WILSON, J. R.; MANCINI, D. M. Factors contributing to the exercise limitation of heart failure. **J Am Coll Cardiol**, Vol. 22, p. 93A–8A, 1993.

WILSON, J. R. Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, Vol. 11, no. 28, p. 2287-92, 1996.

YOON, J. K. et al. Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus. **Dev Biol**, Vol. 2, no. 188, p. 349-62, 1997.

ZAMMIT, P. S. et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**, Vol. 119, p. 1824-32, 2006.

ZHANG, W.; BEHRINGER, R. R.; OLSON, E. N. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. **Genes Dev**, Vol. 11, no. 9, p. 1388-1399, 1995.

*5 CAPÍTULO 1*



## CAPÍTULO 1

### **AEROBIC TRAINING IMPROVES CARDIAC FUNCTION AND CHANGE nAChRs EXPRESSION IN DIAPHRAGM MUSCLE OF RATS WITH HEART FAILURE**

Paula Aiello Tomé de Souza<sup>1</sup>, Rodrigo Wagner Alves de Souza<sup>1</sup>, Dijon Henrique S. Campos<sup>2</sup>, Luana Campos Soares<sup>1</sup>, Warlen Pereira Piedade<sup>1</sup>, Katashi Okoshi<sup>2</sup>, Antônio Carlos Cicogna<sup>2</sup>, Robson Francisco Carvalho<sup>1</sup>, Selma Maria Michelin Matheus<sup>3</sup> Maeli-Dal-Pai-Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Morphology, Bioscience Institute, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Bioscience Institute, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

**Running Title:** Aerobic training in heart failure change nAChRs receptors

**Grant Support:** FAPESP, Process n° 2009/12760-4.

#### **Author correspondence**

Maeli Dal-Pai-Silva

Department of Morphology, Bioscience Institute, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. CEP: 18618-970.

E-mail: maeli@ibb.unesp.br.

Phone: +55 (14) 3811-6264. Ext. 117. Fax Number: +55 (14) 3811-6264

**ARTIGO SUBMETIDO à The FEBS Journal**



## ABSTRACT

Heart failure (HF) is a syndrome initiated by a reduction in cardiac function and characterized by the activation of compensatory mechanisms and muscle myopathy. Fatigue and dyspnea are the most common symptoms of this disease, associated with the reduction of the oxidative capacity, changes in the fibers type I to type II, alterations in the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and in the neuromuscular junction (NMJs). Aerobic training is considered a widely accepted practice to minimize the consequences of the symptoms caused by HF, improving the life quality and can reverse abnormalities of cardiac and skeletal muscle, and modulate the NMJ. The diaphragm is the most important inspiratory muscle in mammals and is one of the most affected in HF; aerobic training changes the electrophysiological properties of the diaphragm during fatigue and promotes muscle endurance. Thus, the hypothesis of this study is that the changes that occur in HF are associated with alterations in the NMJs, in the expression of nAChRs and aerobic training can attenuate these changes. The aim of this study was to evaluate NMJs morphology and the expression of nAChRs subunits in rats with HF submitted to an aerobic training. We used 44 male wistar rats (90 to 100g), divided into four groups: Control (C), Aerobic Training (TR), Aortic Stenosis (AS) and Aortic Stenosis with Aerobic Training (ASTR). Aortic stenosis was induced by the insertion of a silver clip of 0.6 mm in diameter in the ascending aorta. After 18 weeks of surgery, the animals with AS were evaluated by echocardiography for evaluating LV hypertrophy. The others were randomly divided into C, TR and ASTR groups. The animals of TR and ASTR groups were submitted to aerobic training on a treadmill for 10 weeks (5 days/ week). The diaphragm muscle was used to assess the expression of the nAChRs subunits ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta 1$ ) and MRFs (Myogenin and MyoD) by RT-qPCR and Western blot. We also analyzed the distribution of nAChRs along the muscle fiber with immunostaining using  $\alpha$ -bungarotoxin associated with rhodamine and anti-neurofilament. After the immunostaining, morphological analysis was performed using laser scanning confocal microscope and the area of nAChRs was performed by Image J software. Our results showed an increase in the mRNA of  $\gamma$  subunits,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  and  $\beta 1$  in the AS group and decreased expression of  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta 1$  and  $\delta$  in the ASTR group. Only the  $\epsilon$  subunit expression in the group ASTR was more expressed. The expression of the MRFs, Myogenin and MyoD did not change in the groups studied. The immunostaining of nAChRs revealed that there was no difference in the morphology of the receptors that show a distribution as a continuous branches or pretzel. The area analysis revealed a modulation in the distribution of nAChRs, being high in AS(20 at  $30 \mu\text{m}^2$ ) and ASTR(31 at  $40 \mu\text{m}^2$ ) groups. Our study showed changes in the structural and expression of nAChRs subunits during heart failure. Aerobic training was beneficial and attenuated nAChRs subunits changes in the neuromuscular junctions. This protocol could be critical to the intervention of future therapies for life quality improvement in patients with heart failure.

**Keywords:** Skeletal muscle. Heart failure. Aerobic training. Neuromuscular junction. Nicotinic acetylcholine receptors.

## INTRODUCTION

Heart failure (HF) can be defined as the inability of the heart to meet the oxygen and nutrient demands of the tissues, resulting in symptoms of fatigue or dyspnea on exertion which progress to dyspnea at rest (PIÑA et al., 2003). These may be due in part to specific skeletal muscle myopathy characterized by reduced oxidative capacity, a shift from slow fatigue resistant type I to fast less fatigue resistant type II fibers (SOUSA et al., 2000; LOPES et al., 2008) change in gene expression of the myogenic regulatory factors (MRFs) and in nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) of Neuromuscular Junctions (NMJs). (SOUZA et al., 2011).

The neuromuscular junction (NMJs) is a type of synapse formed between motoneurons and skeletal muscle fibers (WU; XIONG; MEI, 2010). The contraction of skeletal muscle is controlled by the neurotransmitter acetylcholine (ACh), which is released from the motor nerve terminal. NMJs is composed by the pre-synaptic nerve terminal, the synaptic cleft and postsynaptic membrane with high density of nicotinic ACh receptors (nAChR) in crest of folds junctional (WOOD; SLATER, 1997; MARTYN; FAGERLUND; ERIKSSON, 2009). The nAChR is a pentameric complex of homologous subunits ( $\alpha$ 1)<sub>2</sub>,  $\delta$ ,  $\beta$ 1, and  $\gamma$  (fetal) or  $\epsilon$  (adult) (WITZEMANN; BRENNER; SAKMANN, 1991; CHARBONNIER et al., 2003) and the interaction between the sarcollema proteins are important for nAChR clustering maintenance (WILLMANN; FUHRER, 2002; SOUZA et al., 2011). To achieve efficient neuromuscular transmission, nAChRs must be densely clustered on the muscle membrane of the NMJ and failure of nAChR clustering is associated with disorders of neuromuscular transmission (HIGUCHI; YAMANASHI, 2011).

Morphological changes in NMJ as dispersion and disruption of AChR clusters caused by acute peripheral nerve injury (KANG; ZAMORANO; GUPTA, 2011) and alterations in nAChR expression have been shown in rats young vs. aged (APEL *et al.*, 2009), as well in heart failure induced by monocrotaline (SOUZA et al., 2011). Large and easily accessed experimentally, this peripheral synapse has highly contributed to understand the general principles in the development of potential therapeutic strategies for muscular disorders (WU; XIONG; MEI, 2010).

The diaphragm muscle (DIAM), important inspiratory muscle, remains active throughout life, sustaining a very high duty cycle compared to other skeletal muscles (~40% compared to 2–15% for limb muscles)(HERNSBERGEN; KERNELL, 1993). However, it is likely that only slow- and fast- twitch fatigue-resistant motor units in the DIAM, comprising type I and IIa fibers, respectively, (SIECK; FOURNIER; ENAD, 1989; SIECK et al., 1995) are recruited to generate inspiratory pressures (SIECK; FOURNIER; ENAD, 1989). The more fatigable fast-twitch motor units, comprising type IIx and IIb fibers (PRAKASH; SIECK, 1998).

There has been a growing consensus that physical training is beneficial for patients with cardiovascular diseases, even those with severe cardiac function changes (GIANNUZZI et al., 2003; SMART, 2011; ERBS et al., 2010). In patients with aortic stenosis, recommendations for physical activity are based on the clinical examination, with special emphasis on the hemodynamic data.

Aerobic training improves the exercise capacity in patients with HF and can partially reverse the abnormalities of skeletal muscle (LINKE et al., 2005; HAMBRECHT et al., 2000), improving the oxidative capacity (MAGNUSSON et al., 1996; WILLIAMS et al., 2007; PU et al., 2012) and the redistribution of blood and oxygen to skeletal muscle (SELIG, et al., 2004).

As the diaphragm muscle is one of the most affected in HF, the hypothesis of our study is that phenotypic changes that occur in this muscle during HF are associated with changes in the distribution and in the expression of nAChRs in the NMJs and the aerobic training can attenuates these changes. The aim of this study was to evaluate the distribution and the expression of nAChRs subunits in diaphragm muscle of rats with HF submitted to an aerobic training.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Experimental animals and study protocol**

All experiments and procedures conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institute of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996; [http://www.nap.edu/openbook.%20php?record\\_id=5140](http://www.nap.edu/openbook.%20php?record_id=5140)) and were approved by the Animal Ethics Committee (Sao Paulo State University, UNESP, CEEA – Protocol 210). Male Wistar weaning rats (3–4 weeks old), weighing 90–100 g, were anaesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.). Aortic constriction was created by placing a 0.6 mm i.d. stainless-steel clip on the ascending aorta via a thoracic incision, as previously described (DING et al., 1999). Control animals underwent left thoracotomy without clip placement. The rats were housed in pathogen-free conditions at 23° C ± 1. They were exposed to a reverse light condition of 12 h of light and 12 h of darkness each day with food and water supplied ad libitum. Initially, animals were distributed into 2 groups: Control (n=22) and Aortic Stenosis (n=22). Eighteen weeks after surgery, aortic stenosis animals presented left ventricular dysfunction by echocardiogram evaluation (PAIVA et al., 2003). The others animals were redistributed in four groups: Control (C, n=11), Control Training (TR, n=11), Aortic Stenosis (AS, n=11) and Aortic Stenosis Training (ASTR, n=11). TR and ASTR groups were submitted to exercise for 10 weeks. After this period, animals of all four groups were resubmitted to the echocardiogram and euthanized for cardiac analyzes and heart failure examination.

### Physical training protocol

The training protocol utilized was modified from Sousa et al. (2002) and Siu et al. (2004). The animals in the ASTR and TR groups were submitted to a treadmill training program, five times per week, for ten weeks. The training protocol is described in Table 1.

The lactate threshold was defined by intensity (speed) of exercise associated with the substantial increase in blood lactate concentration during incremental exercise test (data not show) (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003). The test was started with heating the rats for 5 min at a speed of 5 m / min. After 5 min of passive recovery, the animal was subjected to a progressive effort with an initial velocity of 6 m / min and increments of 3 m / min every 3 minutes. The protocol was terminated when the animal reached exhaustion, determined when it refuses to run even under sound stimulation or when the coordination between the difficult past to present. Between each load increase, the animal was manually removed from the belt to blood collection (BECH et al., 1990).

### Echocardiography evaluation

Rats were anaesthetized with a mixture of ketamine (50mg/kg, i.m.) and xylazine (1mg/kg, i.m.). The chest was shaved and rats positioned on their left side. Using an echocardiograph (HDI 5000 SonoCT; Philips) equipped with a 12MHz transducer, two-dimension guided M-mode images were obtained. M-Mode tracings were obtained from long-axis views of the left ventricle (LV) at or just below the tip of the mitral valve leaflets and at the level of the aortic valve and left atrium (CICOGNA et al., 2002; LITWIN et al., 1995; DOUGLAS et al., 1998). M-Mode images of the LV were recorded on a black-and-white thermal printer (UP-890 MD; Sony, Tokyo, Japan) at a sweep speed of 100mm/s. All LV tracings were measured manually by the same observer, who was blinded to treatment group, according to the leading-edge method of the American Society of Echocardiography (SAHN et al., 1978). Measurements were the mean of at least five cardiac cycles on the M-mode tracings. The following variables were measured: heart rate (HR), LV diastolic dimension (LVDD), LV systolic dimension (LVSD), LV posterior wall (LVWT) and interventricular septum thickness in diastole (IVS), LV relative thickness in diastole (LVRT), endocardial fractional shortening (LVEFS), and posterior wall shortening velocity (LVPWSV). LVDD and LVWT were measured at maximal diastolic dimension, and LVSD was taken at maximal anterior motion of posterior wall. LV systolic function was assessed by calculating  $EFS = \{(LVDD - LVSD) / LVDD \times 100\}$ . LV diastolic function studied transvalvar mitral flow velocity peaks corresponding to the initial filling phase (E wave) and late phase corresponding to atrial contraction (A wave), and E/A ratio. E/A ratio was used as an index of LV diastolic function. Left atrium (LA) was measured at its maximal diameter and aorta (Ao) at end of diastole.

Echocardiogram, as previously described, was performed 18 and 28 weeks after AS induction in all experimental groups. At 28 weeks echocardiography was performed one day after the end of training.

### **Body and cardiac anatomical parameters**

At the 28th week of surgery, animals were anesthetized intraperitoneal with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), the rats were weighed and decapitated. DIAM were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The parameters used to characterize cardiac remodeling were left ventricle (LV), right ventricle (RV), atrium (ATs) weight normalized by final body weight (FBW).

### **Clinical signs and pathological findings of heart failure**

The presence of HF was confirmed by echocardiogram, and at rat sacrifice, was by the following signs: clinical (tachypnea and labored respiration) and pathological (ascite, pleural effusion, left atrium thrombi and right ventricular hypertrophy) (CICOGNA et al., 1999; BOLUYT et al., 2005; BREGAGNOLLO et al., 2005). The analyze was made qualitatively according to the score: + = mild; ++ = moderate and +++ = severe intensity).

### **Confocal microscopy analysis**

Three animals from each group were perfused with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. DIAM was reduced at insertion of the phrenic nerve, dish washed with PBS and incubated with glycine 0.1M for 30 min; after this, samples were dish washed and incubated with collagenase 1% (Tipo I-Sigma C-0130) for 30 min. The samples were dish washed and incubated with 1 µg/mL rhodamine-a-bungarotoxin (Rh-BTX – Molecular Probes) for 40 min at room temperature for distribution of nAChRs in this muscle. After this period, the muscle washing with PBS was incubated with Triton X-100 1% (Sigma T9284) during 1 hour. Then, was overnight in blocking solution. After this period were incubated with primary antibody anti-neurofilament (Anti-neurofilament 200, Sigma N-5389, 1µl:1ml in blocking solution) the 4° C by 12 hours. The next day, were washed with PBS and incubated with secondary antibody anti-mouse-IgG-FITC (Sigma® F-0257, 1µl:1ml in blocking solution) by 3 hours, at 4° C for nerve terminal staining. After washing with PBS, the DIAM was mounted in a Vecta Shield (mounting for fluorescence microscopy) and then observed under a confocal microscope Laser Scanning (Leica®-TCS-SPE).

Comparisons of junctional area (n=95 NMJ per animal) of nAChRs were done using frequency in percent distributed in classes (Class I:  $< 19 \mu\text{m}^2$ ; Class II:  $20\text{-}30 \mu\text{m}^2$ ; Class III:  $31\text{-}40 \mu\text{m}^2$ ; Class IV:  $41\text{-}50 \mu\text{m}^2$  and Class V:  $> 51 \mu\text{m}^2$ ).

### **Gene expression of nAChRs subunits, MyoD and Myogenin MRFs in diaphragm muscle assessed by Real-Time PCR**

After anesthesia, the DIAM of eight animals per group was immediately frozen in liquid nitrogen and processed to assess gene expression. Total RNA was extracted from DIAM with TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), which is based on the guanidine thiocyanate method. Frozen muscles were mechanically homogenized on ice in 1 mL ice-cold TRIzol reagent. Total RNA was solubilized in nuclease-free H<sub>2</sub>O, incubated in DNase I (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any DNA present in the sample, and quantified by measuring the optical density (OD) at 260 nm. Total RNA quantity was determined by the absorbance at 260 nm using NanoVue spectrophotometer (GE healthcare, USA) and the RNA purity was assessed by the A260nm/A280nm and A260nm/A230nm ratios (acceptable when both ratios were  $> 1.8$ ). RNA Integrity was ensured by obtaining a RNA Integrity Number - RIN  $> 8$  with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany). For each sample, cDNA was synthesized from 2  $\mu\text{g}$  total RNA by using components from the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 10  $\mu\text{l}$  of 10X Reverse Transcription Buffer, 4  $\mu\text{l}$  of 25X dNTPs, 10  $\mu\text{l}$  of 10X random primers, 100 units of RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 250 units of MultiScribe™ Reverse Transcriptase; the final volume was adjusted to 100  $\mu\text{l}$  with nuclease-free H<sub>2</sub>O. 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. Two microliters of cDNA, corresponding to 40 ng of total RNA, from the RT reaction was used as a template in the subsequent real-time PCR, performed in a 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the instrument’s universal cycling conditions: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

The reactions were run in duplicate using 0.4  $\mu\text{M}$  of each primer and 2X Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . Gene sequences were selected from the accession numbers in the National Center for Biotechnology Information database and are listed in Table 2. Primer sequences were designed using the primer design function of the software *Primer Express* v3.0 (Applied Biosystems, Foster

City, CA, USA). Melting dissociation curves were performed to confirm that only a single product was amplified. Control reactions were run while omitting cDNA template to check for reagent contamination. Gene expression was compared between individual samples using the  $\Delta\Delta Cq$  method described by (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Expression level the genes, Beta cytoskeletal actin (ACTB), hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and TATA box binding protein (TBP), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Ciclophilin A (CypA) (Table 2), was assessed through *Data Assist software* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and then used as reference genes for data results normalization (VANDESOMPELE et al., 2002).

### **Protein expression of nAChRs subunits, MyoD and Myogenin MRFs in diaphragm muscle assessed by Western Blot**

Protein levels of  $\alpha$ -nAChR,  $\varepsilon$ -nAChR,  $\gamma$ -nAChR, MyoD, Myogenin from diaphragm muscle were determined by Western Blot technique, using  $\beta$ -actin protein as normalizer.

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

Nonspecific binding sites were blocked using bovine serum albumin solution (BSA) 3% in phosphate-saline buffer (PBS-T:  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0,1 M,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween-20 0,1% pH 7,4), for 10 minutes. Membranes were incubated with specific primary antibodies diluted in BSA 1% solution for 10 minutes. After 4 wash steps with PBS-T, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used. Finally, after 4 wash steps, membranes were submitted immunoreactive protein signals were detected using DAB (SIGMA- ALDRICH®, D5637) according manufacturer's instructions. Signals were captured in a immunoblotting film paper and the bands intensities were quantified using a densitometry analysis software (*Image J software* for windows, version 1.43u, National Institutes Health, USA).

**Antibodies.** Primary antibodies included  $\alpha$ -nAChR, 55kDa (rat monoclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California),  $\gamma$ -nAChR, 58kDa (rabbit polyclonal; Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, California),  $\epsilon$ -nAChR, 44-60 kDa (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), myoD, 38 kDa (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, California), myogenin, 36 kDa (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, California) and  $\beta$ -Actin, 43 kDa (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California). The corresponding secondary antibody used was horseradish peroxidase conjugated to goat anti-rat IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California).

### Statistical analysis

Echocardiographical data from control and aortic stenosis groups after 18 week of surgery was analyzed by the Student's *t* test for independent samples (data expressed as mean  $\pm$  standard deviation). Ecocardiography and anatomical parameters of the four groups after 28 week of surgery were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Student Newman Keuls test. In all tests, the significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

The anatomical parameters were analyzed by the Student's *t* test for independent samples when the variable was shown to adhere to a normal probability distribution (data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation) and, by the non-parametric test of Mann-Whitney (data were expressed as median  $\pm$  total semi amplitud) when this characteristic was absent.

The Real-Time PCR data are presented as relative expression (RQ) observed in Data Assist software and are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and the comparison between groups were performed using one-way ANOVA with Tukey post test. In all tests, the significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

The protein expression data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and the comparison between groups were performed using one-way ANOVA with Tukey post test. In all tests, the significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

Statistical calculations were accomplished using *GraphPad Prism* version 5.00 for Windows GraphPad Software, San Diego California USA.



## RESULTS

### Clinical and pathological findings of heart failure

Twenty eight weeks after surgery, the AS group, without training, showed clinical (tachypnea, and labored respiration) and pathological (ascite, pleural effusion, left atrium thrombi and right ventricular hypertrophy) findings of heart failure. The ASTR group presented lower intensity and frequency of the signs reported. The analyze was made qualitatively according to the score: + = mild; ++ = moderate and +++ = severe intensity (Table 3).

### Body and cardiac anatomical parameters

The data of the groups studied after 28 weeks of surgery are presented in the Table 4. There were no differences between C and TR groups. All parameters analyzed, except body weight, were higher ( $p < 0.05$ ) in AS than in C group and also in ASTR when compared to TR group. After the training period, ASTR group presented reduced RV, ATs, RV/FBW and AT/FBW ratios ( $p < 0.05$ ) compared to AS group.

### Echocardiography evaluation

Eighteen weeks after aortic stenosis induction, left ventricular hypertrophy was characterized by increase in LVWT and LVRT, and diastolic dysfunction was demonstrated by an elevated mitral E/A wave. LA/Ao was higher in AS than in C group. Although there was no alteration in LVEFS, LVPWSV was lower in AS than in C group. There were no differences in heart rate, LVDD and LVSD between the groups (Table 5).

At the end of the experiment, 28 weeks after the surgery, all analyzed parameters except LVEFS, LVPWSV and EF were higher in AS compared to C group. The heart rate did not change. LVWT, LVRT and LA/Ao were higher in ASTR than in TR group. Comparing ASTR to AS group, LVDD, LVSD, Vol VED, E/A and EF values decreased; LVEFS and LVPWSV increased (Table 6).

### Confocal microscopy analysis of nAChRs

In all groups studied, the nAChRs were distributed in clusters forming continuous branches that were elongated along the muscle fibers (Figure 1A, B and C).

Confocal microscopy analysis of AS and ASTR groups did not show changes in the nAChRs clusters. In the C and TR groups, there were a high frequency of the nAChRs clusters area in the class 20-30  $\mu\text{m}^2$ . AS and ASTR groups showed a high frequency of the nAChRs clusters area in the class 31-40  $\mu\text{m}^2$  (Figure 1D).

### **Gene expression of nAChRs subunits, MyoD and Myogenin MRFs in diaphragm muscle assessed by Real-Time PCR**

All groups studied showed similar pattern of mRNA expression of the  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta 1$ -nAChR subunits: AS group presented a higher mRNA expression in all nAChR subunits compared with the C group; ASTR group showed a decrease in all nAChR subunits compared to AS group. The  $\delta$  subunit did not show significant difference between the groups. The  $\epsilon$ -nAChR subunit showed a continuous increase in the expression in the TR group, AS, ASTR, comparing to the C group (Figure 2).

The Myogenin gene expression increased only in AS group comparing to the C group; ASTR group showed a decrease in the expression but the result was not significant. MyoD mRNA level did not change in all groups studied (Figure 3).

### **Protein expression of nAChRs subunits, MyoD and Myogenin MRFs in diaphragm muscle assessed by Western Blot**

We analyze the protein expression of the  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits of nAChRs. There were an increase of the  $\alpha$  subunit expression in AS comparing to C group. ASTR group showed a decrease in the expression in comparison to the AS group. The  $\epsilon$  subunit expression was high in ASTR comparing to the AS group (Figure 4). We did not detect the  $\gamma$  subunit expression. We believe that this fact occurred because this is a fetal subunit, low expressed in adult muscle.

The Myogenin and MyoD protein expression showed a similar pattern, although there were no significant differences between the groups (Figure 5).

## **DISCUSSION**

Our results showed that aerobic training administered in rats with aortic stenosis and left ventricular dysfunction before the onset of heart failure increased the survival by preventing a worsening of cardiac function. The main criterion for the diagnosis of ventricular dysfunction in experimental studies has been the level of LV end-diastolic pressure assessed by hemodynamic method (TANAKA et al., 1996). However, its determination requires an invasive procedure, which makes longitudinal studies. In addition, LV catheterization can cause damage to the aortic valve or affect cardiac performance (SINGER et al., 2005). Therefore, echocardiography was used to evaluate in our study. This is an alternative method for study of ventricular function and can provide important information about cardiac performance in rodents (TANAKA et al., 1996), which allows the analysis of morphological and functional changes caused by different types of aggression (PAIVA et al., 2003; SATOH et al., 2003; BREGAGNOLLO et al., 2007) and interventions (ONO

et al., 2002; BREGAGNOLLO et al., 2005). It is versatile, safe, painless, noninvasive, and relevant to the analysis in vivo (SAHA et al., 2007).

After 18 weeks of supra-aortic stenosis, cardiac remodeling was observed in the echocardiographic assessment. The various parameters indicative of left ventricular hypertrophy characterize the type of concentric hypertrophy. Functional analysis showed a decrease in systolic and diastolic dysfunction, manifested by decreased velocity of shortening of the posterior wall and increased E / A ratio, respectively. Although there was a ventricular cardiac dysfunction, the animals show no signs of heart failure. The structural and functional data from this investigation are in agreement with previous studies (CARVALHO et al., 2003; OKOSHI et al., 2004; BOLUYT et al., 2005; BREGAGNOLLO et al., 2007).

The deterioration of cardiac function in aortic stenosis may be related to the following factors: adverse geometric remodeling cavity (MANN, 1999; NORTON et al., 2002), myocardial structural changes such as increased extracellular matrix (BOLUYT et al., 1994), decrease in the number of myocytes by necrosis or apoptosis (BOLUYT et al., 2005; HOUSER; MARGULIES, 2003), changes in traffic calcium (BOLUYT et al., 2005), changes in energy balance (HOUSER; MARGULIES, 2003) or a combination of these factors (BOLUYT et al., 1994; BOLUYT et al., 2005). The improvement in systolic and diastolic function after training may be related to the restoration of one or more of the mentioned factors that are involved in the change of cardiac performance.

Based on morphological analysis the distribution of nAChRs in NMJs showed a normal pattern called "continuous branches" or "pretzel." The distribution of the nerve terminal was normal and followed the arrangement of the receptors, with their branches covering the nerve terminal in a continuous extension. There were an increase in nAChRs area in AS and ASTR compared to C groups. This fact can be related to the muscle fiber modulation that frequently occurs during Heart Failure (HF). Diaphragm muscle change the phenotypic characteristic for a more oxidative during HF increasing the muscle fiber type I. It is known that in I fiber type the NMJs are small than in II fiber type (MATHEUS; SOARES, 2006). It is possible that, in our study, in AS group the muscle fiber modulation toward a more oxidative did not occur completely, but our results could infer a gradual transition toward a oxidative fibers. The training did not change the nAChRs area. Prakash and Sieck (1998) showed a significant expansion in NMJs area on type IIx and IIb fibers in rat diaphragm muscle with aging. Marques and Santo Neto (2002) suggest that metabolic changes observed in diabetic mice also affect the distribution of nAChRs receptors and change in the receptors distribution can occur in cases of denervation (ERMILOV et al., 2007; WANG et al., 2004).

In our case, the increased nAChRs area in AS and ASTR groups can be related to the increased ability to effectively sustain neuromuscular transmission that occur during HF for generate muscle contraction (ERMILOV et al., 2007).

In our study we observed that heart failure promoted an increase in gene expression in all nAChR subunits comparing to the C group and aerobic training promoted a slight to moderate decrease in the nAChR subunits gene expression compared to AS group. The  $\epsilon$ -nAChR subunit showed a continuous increase in the expression in the TR groups, AS, ASTR, comparing to the C group.

Several studies have shown alterations in nAChR expression in some conditions including: (1) mice deficient in  $\epsilon$ -nAChR subunit die prematurely due to severe deficiency of nAChRs that leads to progressive reduction of the density of nAChRs at the neuromuscular endplate in myasthenic diseases (SCHWARZ et al., 2000), (2) in cases of denervation there is an increase in gene expression of all subunits and promoters in the expression of fetal type, while the electrical stimulation prevents this induction (ADAMS et al., 1995), (3) alterations in muscle fiber type composition (JIN; WERNIG; WITZEMANN, 2008) and (4) relative muscle activity (ROTZLER; BRENNER, 1990). Recent research conducted in our lab showed change in  $\alpha$  and  $\epsilon$  nAChRs subunits expression during heart failure induced by monocrotaline (SOUZA et al., 2011).

Skeletal muscle myopathy that occur during HF may be partially due to the shift from muscle fibers (LIPKIN et al., 1988; MANCINI et al., 1992; SULLIVAN; GREEN; COBB, 1990; SOUSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2003). Given that the  $\alpha 1$  subunit of the nAChR contains the binding site for the ACh neurotransmitter, which promotes opening of the ion channel during muscle contraction (ARIAS, 1997), an increase in the gene expression of these subunit in AS group could influence the NMJ modulation and muscle contraction. The decreasing in this subunit expression in ASTR show that the aerobic training was efficient to change the  $\alpha 1$  subunit of the nAChR activity, although the nAChR morphology was similar in AS and ASTR groups. On the other hand, the increased gene expression of the epsilon subunit may be associated with the high expression level of the  $\alpha 1$  subunit, because, according to Schwarz et al. (2000), the epsilon subunit is essential for the structural maintenance of the NMJ thus contributing to the maintenance of the ACh subunit receptor structure (KALAMIDA et al., 2007).

AS group presented a high expression of  $\gamma$  subunit. This subunit is expressed during the embryonic and fetal period and in NMJs during denervation. In the last situation, increased embryonic type receptor expression ( $\gamma$  subunit) may be a consequence of other events that are required for maintenance of muscle in a receptive state for reinnervation and functional recovery (ADAMS et al., 1995). In our study, we think that the increase in  $\gamma$  subunit can be related to the

change in muscle fiber that frequently occur during heart failure (CARVALHO et al., 2003). This fact did not occur in HF induced by monocrotaline, drug that induce this syndrome in a short period (22 days). (SOUZA et al., 2011). The training was effective to reduce the expression of this subunit. Similar behavior was detected for the structural subunits  $\beta 1$  and  $\delta$  -nAChR, with the last not statistically significant.

Although the MyoD expression did not change between the groups, the expression pattern was similar to the  $\epsilon$ -nAChR subunit. Ma et al. (2007) showed an increase in gastrocnemius MyoD expression and change in nAChRs subunits one month after tibial nerve injury. The authors suggest that the upregulation of MyoD during this period may play a significant role in the NMJs stabilization. In our study, based on the results obtained, it is possible that MyoD is not involved in the control of NMJs stabilization.

Similar to MyoD, myogenin gene expression did not change between the groups. However, AS group showed a tendency for an increase in the Myogenin mRNA and in ASTR a tendency in a decrease of the Myogenin expression was observed. The expression pattern was similar to the  $\alpha$ -nAChR,  $\gamma$ -nAChR,  $\beta 1$ - nAChR and  $\delta$ -nAChR subunits. Macpherson et al. (2006) found that myogenin expression is essential for a nAChR clustering during muscle differentiation. The expressions of MRFs and nAChRs (NUMBERGER et al., 1991; PRODY; MERLIE, 1991; MA et al., 2007) require a specific sequence E-box (or CACCTG CAGCTG) and suggests that proteins binding to the region E-box are required for the expression of molecules that organize the NMJ structure. Then, in our study, the myogenin could be involved with the  $\alpha$ -nAChR,  $\gamma$ -nAChR,  $\beta 1$ -nAChR and  $\delta$ -nAChR subunits expression, but others molecules also have an important function in regulating the nAChR subunits activity.

Our study showed changes in the distribution and expression of nAChRs subunits during heart failure. Aerobic training was beneficial and attenuated nAChRs subunits changes in the neuromuscular junctions. This protocol could be critical to the intervention of future therapies for life quality improvement in patients with heart failure.

### **Acknowledgements**

This study was supported by FAPESP, Process number 2009/12760-4. This work is part of the M.Sc. Thesis that will be presented by Paula Aiello Tomé de Souza to São Paulo State University, UNESP, Bioscience Institute, in 2012.

## REFERENCES

- ADAMS, L. et al. Adaptation of nicotinic acetylcholine receptor, myogenin, and MRF4 gene expression to long-term muscle denervation. **The Journal of cell biology**, Vol. 131, no. 5, p. 1341-9, Dec. 1995.
- APEL, P. J. et al. How age impairs the response of the neuromuscular junction to nerve transection and repair: an experimental study in rats. **Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society**, Vol. 27, no. 3, p. 385-93, Mar. 2009.
- ARIAS, H. R. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. **Brain research reviews**, Vol. 25, no. 2, p. 133-91, Oct. 1997.
- BECH, O. et al. Effects of long-term coenzyme Q10 and captopril treatment on survival and functional capacity in rats with experimentally induced heart infarction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Vol. 255, no. 1, p. 346, 1990.
- BOLUYT, M. O. et al. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. **Circulation Research**, Vol. 75, no. 1, p. 23-32, Jul. 1994.
- BOLUYT, M.O. et al. Heart failure after long-term supraaortic constriction in rats. **American Journal of Hypertension**, Vol. 18, no. 2, p. 202-212, 2005.
- BREGAGNOLLO, E. A. et al. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Vol. 84, no. 3, p. 225-32, mar. 2005.
- BREGAGNOLLO, E. A. et al. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. **International Journal of Cardiology**, Vol. 117, no. 1, p. 109-114, Apr. 2007.
- BREGAGNOLLO, E.A. et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supraaortic aortic stenosis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Vol. 88, no. 2, p. 225-233, 2007a.
- CARVALHO, R. F. et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **International Journal of Experimental Pathology**, Vol. 84, no. 4, p. 201-6, Aug. 2003.
- CHARBONNIER, F. et al. Specific activation of the acetylcholine receptor subunit genes by MyoD family proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 278, no. 35, p. 33169-74, Aug. 2003.
- CICOGNA, A. et al. Direct effects of colchicine on myocardial function studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, p. 60-65, 1999.
- CICOGNA, A. et al. Volume overload influence on hypertrophied myocardium function. **Japanese Heart Journal**, Vol. 43, no. 6, p. 689-695, Nov. 2002.

DING, B. et al. Pressure Overload Induces Severe Hypertrophy in Mice Treated With Cyclosporine , an Inhibitor of Calcineurin. **Circulation Research**, p. 729-734, 1999.

DOUGLAS, P. S. et al. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. **Journal of the American College of Cardiology**, Vol. 32, no. 4, p. 1118-25, Oct. 1998.

ERBS, S. et al. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. **Circulation Heart Failure**, Vol. 3, no. 4, p. 486-494, Jul. 2010.

ERMILOV, L. G. et al. Safety factor for neuromuscular transmission at type-identified diaphragm fibers. **Muscle & Nerve**, Vol. 35, no. 6, p. 800-803, Jun. 2007.

GIANNUZZI, P. et al. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the exercise in left ventricular dysfunction and chronic heart failure (ELVD-CHF) trial. **Circulation**, Vol. 108, no. 5, p. 554-559, Aug. 2003.

HAMBRECHT, R. et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: a randomized trial. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Vol. 283, no. 23, p. 3095-3101, Jun. 2000.

HERNSBERGEN, E.; KERNELL, D. Daily duration of activity in ankle muscles of cats. Glasgow, 1993. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 32., **Proceedings...** Glasgow, Vol. 18, 1993.

HIGUCHI, O.; YAMANASHI, Y. Molecular mechanisms underlying the formation of neuromuscular junction. **Brain Nerve**, Vol. 63, no. 7, p. 649-655, Jul. 2011.

HOUSER, S. R.; MARGULIES, K. B. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? **Circulation Research**, Vol. 92, no. 4, p. 350-358, Mar. 2003.

JIN, T. E.; WERNIG, A.; WITZEMANN, V. Changes in acetylcholine receptor function induce shifts in muscle fiber type composition. **The FEBS journal**, Vol. 275, no. 9, p. 2042-2054, May 2008.

KALAMIDA, D. et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. **The FEBS journal**, Vol. 274, no. 15, p. 3799-3845, Aug. 2007.

KANG, J. R.; ZAMORANO, D. P.; GUPTA, R. Limb salvage with major nerve injury: current management and future directions. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, Vol. 19, Suppl 1, p. 28-34, Jan. 2011.

LINKE, A. et al. Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. **Circulation**, Vol. 111, no. 14, p. 1763-70, Apr. 2005.

LIPKIN, D. P. et al. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **International Journal Cardiology**, Vol. 18, p. 187-195, 1988.

LITWIN, S. E. et al. Serial echocardiographic-doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, Vol. 91, no. 10, p. 2642–2654, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. San Diego, **Methods**, Vol. 25, no. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LOPES, F. D. S. et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. **International Journal of Experimental Pathology**, Vol. 89, no. 3, p. 216-222, Jun. 2008.

MA, J. et al. Gene expression of myogenic regulatory factors, nicotinic acetylcholine receptor subunits, and GAP-43 in skeletal muscle following denervation in a rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, Vol. 25, no. 11, p. 1498-1505, Nov. 2007.

MACPHERSON, P. C. D.; CIESLAK, D.; GOLDMAN, D. (2006). Myogenin-dependent nAChR clustering in aneural myotubes. **Molecular and cellular neurosciences**, Vol 31, no. 4, p. 649-60, 2006.

MAGNUSSON, G. et al. High intensity knee extensor training, in patients with chronic heart failure: major skeletal muscle improvement. **European Heart Journal**, Vol. 17, no. 7, p. 1048-55, Jul. 1996.

MANCINI, D. M. et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation**, Vol. 85, no. 4, p. 1364–1373, 1992.

MANN, D. L. Mechanisms and models in heart failure: a combinatorial approach. **Circulation**, Vol. 100, p. 999-1008, Aug. 1999.

MARQUES, M. J.; SANTO NETO, H. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of non-obese diabetic mice. **The Anatomical Record**, Vol. 267, no. 2, p. 112-119, 2002.

MARTYN, J. A. J.; FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Basic principles of neuromuscular transmission. **Anaesthesia**, Vol. 64, Suppl. 1, p. 1-9, Mar. 2009.

MATHEUS, S.M.M; SOARES, J. C. Ultrastructural study of muscle fibers and neuromuscular junctions in the opossum thyroarytenoid muscle. **Braz. J. Morphol. Sci.**, Vol. 23, no. 1, p. 229-235, 2006.

NORTON, G. R. et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy: the relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, Vol. 39, no. 4, p. 664-671, Feb. 2002.

NUMBERGER, M. et al. Different mechanisms regulate muscle-specific AChR gamma-and epsilon-subunit gene expression. **EMBO Journal**, Vol. 10, no. 10, p. 2957-2964, Oct. 1991.



OKOSHI, K. et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. **Japanese Heart Journal**, Vol. 45, no. 4, p. 647–656, 2004.

ONO, K. et al. Echo doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. **Journal of the American Society of Echocardiography**, Vol. 15, no. 2, p. 109-117, Feb. 2002.

PAIVA, S. A. R. de. et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. **Am J. Physiol Heart Circ. Physiol.**, Vol. 284, p. H2242-2246, Jun. 2003.

PIÑA, I. L. et al. Exercise and heart failure. **Circulation**, Vol. 107, no. 8, p. 1210–1225, 2003.

PRAKASH, Y. S.; SIECK, G. C. Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers. **Muscle & Nerve**, Vol. 21, no. 7, p. 887-95, Jul. 1998.

PRODY, C. A; MERLIE, J. P. A developmental and tissue-specific enhancer in the mouse skeletal muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene regulated by myogenic factors. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 266, no. 33, p. 22588-22596, Nov. 1991.

PU, C. T. et al. Randomized trial of progressive resistance training to counteract the myopathy of chronic heart failure randomized trial of progressive resistance training to counteract the myopathy of chronic heart failure. **Journal Appl. Physiol.**, Vol. 90, p. 2341-2350, 2012.

ROTZLER, S.; BRENNER, H. Metabolic stabilization of acetylcholine receptors in vertebrate neuromuscular junction by muscle activity. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 111, no. 2, p. 655–661, 1990.

SAHA, D. C. et al. Comparison of cardiovascular effects of TiletamineZolazepam, Pentobarbital, and KetamineXylazine in male rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, Vol. 46, no. 2, p. 74–80, 2007.

SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, Vol. 58, no. 6, p. 1072-1083, Dec. 1978.

SATOH, S. et al. Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on sarcoplasmic reticulum function in the failing heart of the Dahl rat. **Circulation Journal**, Vol. 67, no. 8, p. 705-711, Aug. 2003.

SCHWARZ, H. et al. Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in epsilon-subunit-deficient mice. **The European Journal of Neuroscience**, Vol. 12, no. 9, p. 3107-3116, Sep. 2000.

SELIG, S; et al. Moderate-intensity resistance exercise training in patients with chronic heart failure improves strength, endurance, heart rate variability, and forearm blood flow. **Journal of Cardiac Failure**, Vol. 10, no. 1, p. 21-30, Feb. 2004.

SIECK, G. C.; FOURNIER, M.; ENAD, J. G. Fiber type composition of muscle units in the cat diaphragm. **Neuroscience Letters**, Vol. 97, p. 29-34, 1989.

SIECK, G. C. et al. SDH and actomyosin ATPase activities of different fiber types in rat diaphragm muscle. **Journal Appl. Physiol.**, Vol. 79, no. 5, p. 1629-1639, 1995.

SINGER, A.J.; REGEV, R.; WEEKS, R.; TLOCKOWSKI, D.S. Laser-assisted anesthesia prior to intravenous cannulation in volunteers: a randomized, controlled trial. **Acad Emerg Med**, Vol. 12, no. 9, p. 804-7, 2005.

SIU, P. M. et al. Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. **Journal of Applied Physiology**, Vol. 97, no. 1, p. 277-285, Jul. 2004.

SMART, N. Exercise training for heart failure patients with and without systolic dysfunction: an evidence-based analysis of how patients benefit. **Cardiology Research and Practice**, Vol. 2011, p. 1-7, Sep. 2011.

SOUSA, E. et al. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. **Circulation**, Vol. 102, p. 1847-1853, Oct. 2000.

SOUSA, E. et al. Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. **Cardiovascular Research**, Vol. 56, p. 260-268, Jun. 2002.

SOUZA, P. A. T. de et al. Morphological aspects of neuromuscular junctions and gene expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in skeletal muscle of rats with heart failure. **Journal of Molecular Histology**, Vol. 42, no. 6, p. 557-565, Dez. 2011.

SULLIVAN, M. J.; GREEN, H. J.; COBB, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, Vol. 81, no. 2, p. 518-527, 1990.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian Journal of Applied Physiology**, Vol. 28, no. 2, p. 299-323, Apr. 2003.

TANAKA, N. et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. **Circulation**, Vol. 94, no. 5, p. 1109-1117, 1996.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, Vol. 3, no. 7, 2002.

WANG, T. J. et al. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. **The New England Journal of Medicine**, Vol. 350, no. 7, p. 655-663, Feb. 2004.

WILLIAMS, A. D. et al. Circuit resistance training in chronic heart failure improves skeletal muscle mitochondrial ATP production rate--a randomized controlled trial. **Journal of Cardiac failure**, Vol. 13, no. 2, p. 79-85, Mar. 2007.

WILLMANN, R.; FUHRER, C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. **Cell. Mol. Life. Sci.**, Vol. 59, no. 8, p. 1296- 1316, 2002.

WITZEMANN, V; BRENNER, H. R.; SAKMANN, B. Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. **The Journal of Cell Biology**, Vol. 114, no. 1, p. 125-141, 1991.

WOOD, S. J.; SLATER, C. R. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. **Journal of Physiology**, Vol. 500, no.1, p. 165-176, 1997.

WU, H.; XIONG, W. C.; MEI, L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. **Development**, Vol. 137, no. 7, p. 1017-1033, 2010.

**Table 1.** Physical training protocol.

<b>Weeks</b>	<b>Duration (min)</b>
1	5
2	10
3	12
4	14
5	16
6	18
7	20
8	20
9	22
10	22

**Fonte:** Adaptado de Sousa et al. (2002) e Siu et al. (2004).

**Table 2:** Oligonucleotide primers used for real-time PCR amplification of reverse transcribed RNA

Gene	Accession no.	Seqüência of primer (5' – 3')	PCR lenght (pb)
<i>Gamma</i>	NM_019145	F:CCACCAGAAGGTGGTGTCT R:TGAGGAGATGAGCACACAGG	91
<i>Alpha 1</i>	NM_024485	F:TCCCTTCGATGAGCAGAACT R:AGCCGTCATAGGTCCAAGTG	56
<i>Epsilon</i>	NM_017194	F:GGCTCAACTTCAGCAAGGAC R:AGCCATACATGTTCCGAAGG	70
<i>Beta 1</i>	NM_012528.1	F:CATCGAGTCTCTCCGTGTCA R:GGCAACGTCAAAGTTCCAT	88
<i>Delta</i>	NM_019298.1	F:ACCACCAAGACGTCACCTTC R:CCGAGGTCTTCTCTCCACAG	144
<i>MyoD</i>	NM_176079.1	F:TTTTTCATGCGACTCACAGC R:GAAGGCAGGGCTTAAGTGTG	137
<i>Myogenin</i>	M24393	F:TGCCACAAGCCAGACTACCCACC R:CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA	246
<i>TBP</i>	NM_001004198.1	F:GCCACGAACAACCTGCGTTGAT R:AGCCCAGCTTCTGCACAACCTA	132
<i>ACTB</i>	NM_031144	F:TCAGGTCATCACTATCGGCAATG R:TTTCATGGATGCCACAGGATTC	61
<i>HPRT</i>	NM_012583	F:CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R:GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	123
<i>GAPDH</i>	NM_017008.3	F:CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA R:GGCATGGACTGTGGTCATGA	118
<i>Cyclophilin A</i>	NM_017101.1	F:TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R:CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	127

Accession no. GenBank accession number, *bp* base pairs

**Table 3.** Clinical and pathological data from aortic stenosis AS (n = 9) and aortic stenosis with physical training ASTR (n = 9) 28 weeks after surgery.

HF signs	Groups	Symptom intensity	Relative frequency (%)
Tachypnea	AS	+	33
	AS	++	67
	ASTR	+	33
Ascite	AS	+	22
	AS	++	78
	ASTR	+	55
Pleural Effusion	AS	+	56
	AS	++	22
	AS	+++	22
	ASTR	+	55
Left atrium thrombi		AS	56
		ASTR	11

Intensity: + = mild; ++ = moderate; +++ = severe.

**Table 4.** Anatomical parameters cardiac of four groups (n = 11): Control (C), Control Training (TR), Aortic Stenosis (AS) and Aortic Stenosis Training (ASTR) 28 weeks after surgery.

<b>Parâmetros</b>	<b>C</b>	<b>TR</b>	<b>AS</b>	<b>ASTR</b>
Body Weight (g)	489.4 ± 29.3	475.3 ± 47.9	464.3 ± 35.6	440 ± 45.2
LV (g)	0.77 ± 0.07	0.65 ± 0.07	1.15 ± 0.15 *	1.06 ± 0.13 †
LV/FBW (mg/g)	1.57 ± 0.18	1.37 ± 0.2	2.53 ± 0.23 *	2.45 ± 0.22 †
RV (g)	0.25 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.46 ± 0.10 *	0.35 ± 0.09 † #
RV/FBW (mg/g)	0.51 ± 0.09	0.51 ± 0.04	1.00 ± 0.26 *	0.86 ± 0.25 † #
ATs (g)	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.40 ± 0.08 *	0.28 ± 0.09 † #
ATs/FBW (mg/g)	0.23 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.87 ± 0.17 *	0.64 ± 0.22 † #

*LV: left ventricular weight; FBW: body weight; RV: right ventricular weight; ATs: atrium weight*  
*Values are means ± SD . \* p < 0.05 compared to C; † p < 0.05 compared to TR; # p < 0.05 compared to AS.*

**Table 5.** Echocardiographical evaluation for control (C, n=11) and aortic stenosis groups (AS, n=11), 18 weeks after surgery.

Parameters	Groups	
	C	AS
Heart Rate (bpm)	293 ± 34	284 ± 34
LVDD (mm)	8.01 ± 0.46	8.23 ± 0.75
LVSD (mm)	3.61 ± 0.56	3.78 ± 1.04
LVWT (mm)	1.44 ± 0.08	2.06 ± 0.21 *
LVRT (mm)	0.36 ± 0.04	0.50 ± 0.05 *
LA / Ao	1.47 ± 0.16	1.91 ± 0.27 *
LVEFS (%)	55.29 ± 5.89	54.48 ± 9.58
LVPWSV (mm/s)	39.41 ± 4.47	27.34 ± 5.63 *
E/A	1.46 ± 0.28	5.06 ± 2.61 *

*LV: left ventricle; LVDD: LV diastolic diameter; LVSD: LV systolic diameter; LVWT: LV posterior wall thickness; LVRT: LV relative thickness in diastole; LA/Ao ratio: left atrium/aorta; LVEFS: LV endocardial fractional shortening; LVPWSV: LV posterior wall shortening velocity; E/A ratio: E wave mitral flow; A wave mitral flow. Values are means ± SD. \* p < 0.05 compared to C.*

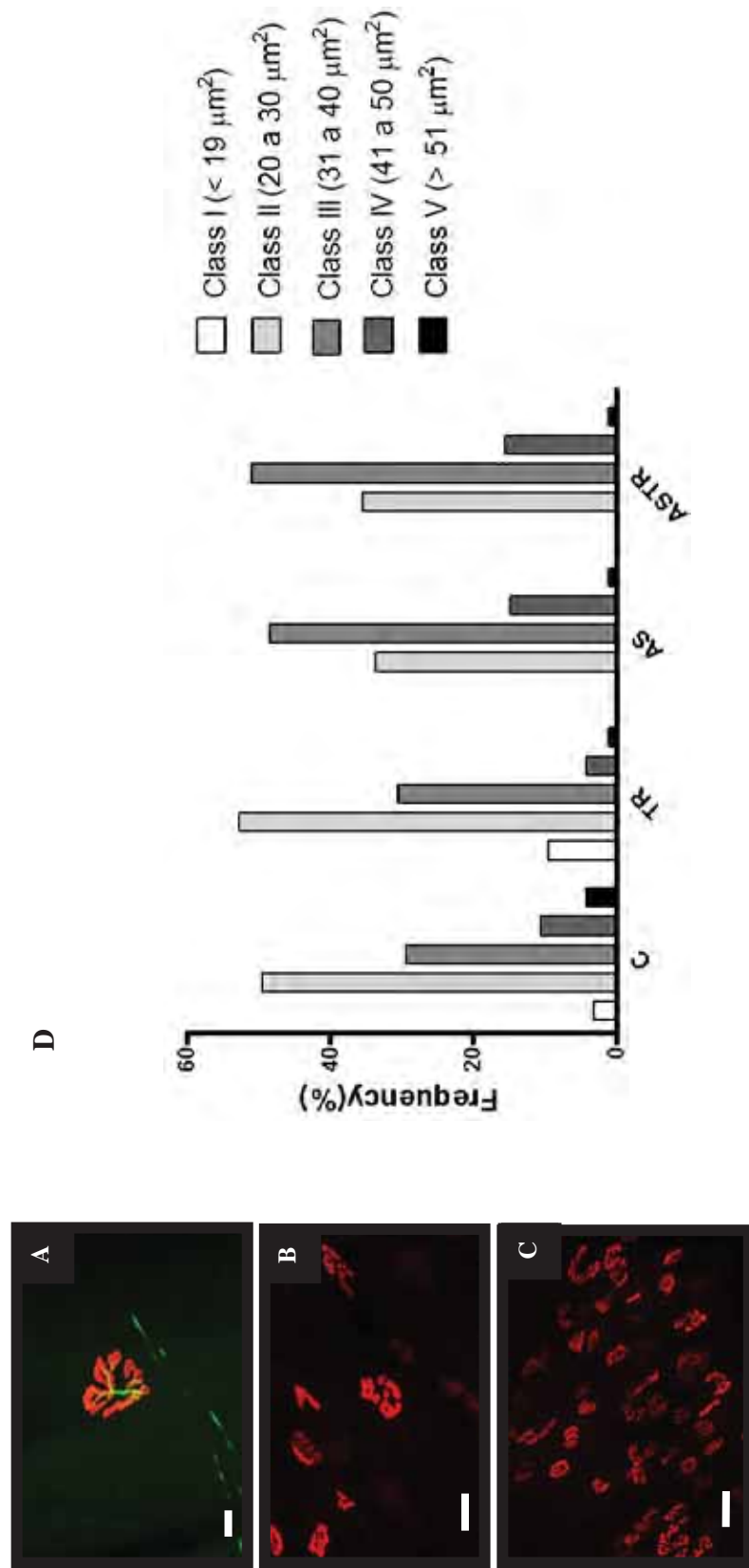


**Table 6.** Echocardiographical for control (C, n= 11), trained (TR, n= 11), aortic stenosis (AS, n= 11) and aortic stenosis with physical training (ASTR, n= 11) groups 28 weeks after surgery.

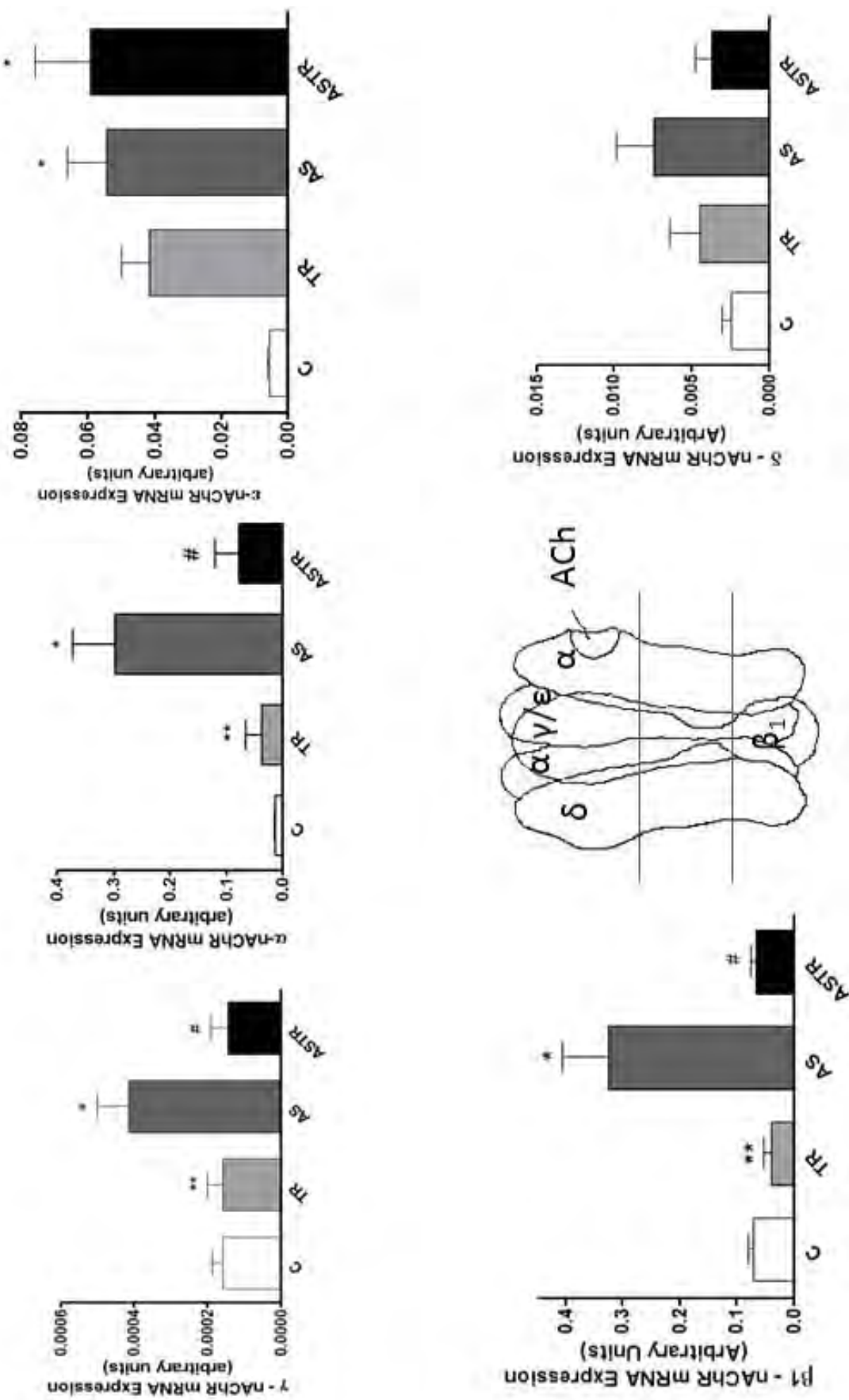
Parameters	Groups			
	C	TR	AS	ASTR
Heart Rate (bpm)	317 ± 38	310 ± 49	282 ± 49	282 ± 55
LVDD (mm)	8.40 ± 0.65	8.42 ± 0.38	9.14 ± 0.32 *	8.19 ± 0.77 #
LVSD (mm)	3.82 ± 0.63	3.84 ± 0.36	5.05 ± 0.60 *	3.41 ± 1.11 #
LVWT (mm)	1.46 ± 0.05	1.43 ± 0.07	2.27 ± 0.20 *	2.15 ± 0.25 †
LVRT	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.51 ± 0.05 *	0.53 ± 0.08 †
LA / Ao	1.44 ± 0.09	1.56 ± 0.18	2.21 ± 0.30 *	2.08 ± 0.24 †
Vol VED (ml)	0.57 ± 0.11	0.60 ± 0.08	0.73 ± 0.11 *	0.56 ± 0.15 #
LVEFS (%)	55.3 ± 4.40	54.4 ± 4.02	44.8 ± 7.20 *	58.8 ± 10.72 #
LVPWSV (mm/s)	37.72 ± 4.81	37.17 ± 3.51	23.39 ± 3.72 *	29.18 ± 5.17 †#
E/A	1.33 ± 0.31	1.36 ± 0.23	7.93 ± 1.75 *	4.24 ± 2.70 †#
EF	0.90 ± 0.03	0.90 ± 0.03	0.82 ± 0.07 *	0.92 ± 0.06 #

*LV: left ventricle; LVDD: LV diastolic diameter; LVSD: LV systolic diameter; LVWT: LV posterior wall thickness; LVRT: LV relative thickness in diastole; LA/Ao ratio: left atrium/aorta; Vol VED: LV volume at end diastole; LVPWSV: LV posterior wall shortening velocity E/A ratio: E wave mitral flow; A wave mitral flow; EF: ejection fraction. Values are means ± SD. \* p < 0.05 compared to C; † p < 0.05 compared to TR; # p < 0.05 compared to EAo.*

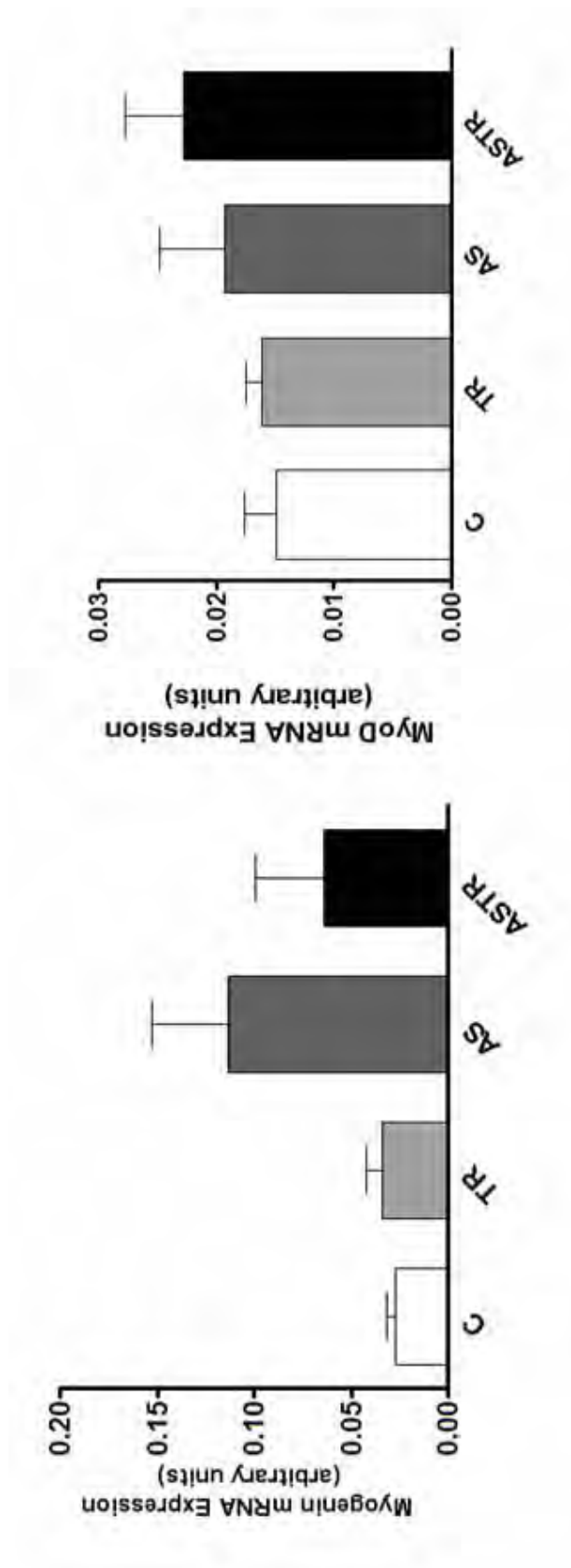
**Figure 1.** (A) General view of diaphragm muscle nAChRs and terminal axon. The acetylcholine receptor was labeled by  $\alpha$ -bungarotoxin associated with rhodamine (red) terminal axon was labeled by anti-neurofilament (green). Scale bar: **A** = 10  $\mu\text{m}$ ; **B** = 40  $\mu\text{m}$  e **C** = 40  $\mu\text{m}$ . (D) Frequency distribution (%) of nAChRs area in rat diaphragm muscle.



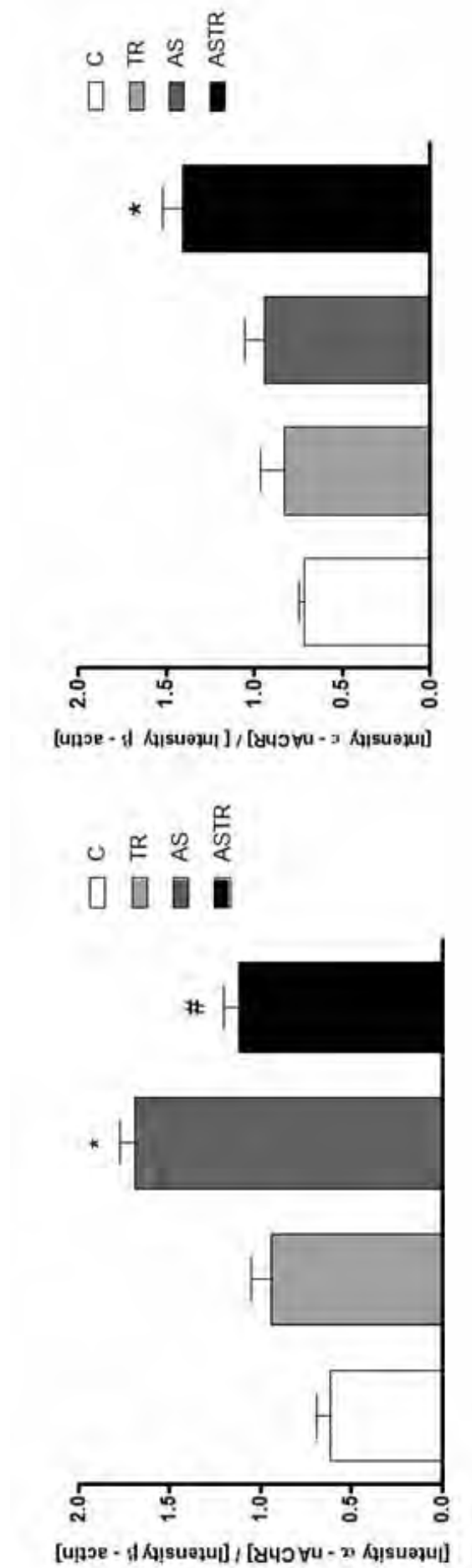
**Figure 2.** mRNA expression of nAChRs subunits in the diaphragm muscle of C, TR, AS and ASTR groups. Values are means  $\pm$  SD. n= 7 rats per group. \* Significant difference compared to their respective C, \*\* Significant difference AS compared to their respective TR, # Significant difference AS compared to their respective ASTR ( $p < 0.05$ ) (ANOVA + Tukey test).



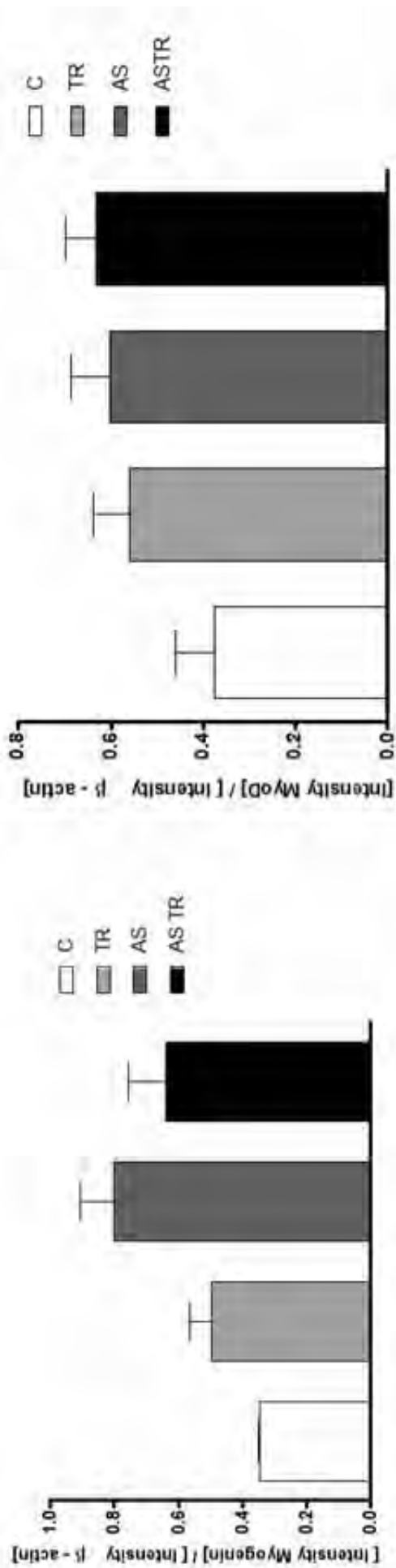
**Figure 3.** Myogenin and MyoD mRNA expression in the diaphragm muscle of C, TR, AS, ASTR groups. Values are means  $\pm$  SD. n= 7 rats per group. No significant difference ( $p < 0.05$ ) (ANOVA + Tukey test).



**Figure 4.**  $\alpha$ -nAChRs and  $\epsilon$ -nAChRs protein expression in the diaphragm muscle of C, TR, AS, and ASTR groups. Values are means  $\pm$  SD. n=8 rats per group. \* Significant difference compared to their respective control at ( $p < 0.05$ ) (ANOVA + Tukey test). # Significant difference compared to AS groups at ( $p < 0.05$ ) (ANOVA + Tukey test).



**Figure 5.** Miogenin and MyoD protein expression in the diaphragm muscle of C, TR, AS, and ASTR groups. Values are means  $\pm$  SD. n= 8 rats per group. No significant difference ( $p < 0.05$ ) (ANOVA + Tukey test).



## ***6 CONCLUSÕES***



Os resultados obtidos em nosso trabalho permitiram concluir que:

### ***A Insuficiência Cardíaca***

- Não altera a morfologia dos nAChRs e apresentam a forma pretzel ou braços contínuos.
- Modula a distribuição dos nAChRs, formando uma área maior no grupo AS(31 a 40  $\mu\text{m}^2$ ).
- Aumenta a expressão gênica das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$  dos nAChRs.
- Aumenta a expressão protéica das subunidades  $\alpha$ ,  $\epsilon$  dos nAChRs.
- Aumenta a expressão gênica e protéica dos MRFs (Miogenina e MyoD) (dados não significativos estatisticamente).

### ***A Insuficiência Cardíaca com Treinamento Aeróbico***

- Não altera a morfologia dos nAChRs e apresentam a forma pretzel ou braços contínuos.
- Modula a distribuição dos nAChRs, formando uma área maior no grupo ASTR(31 a 40  $\mu\text{m}^2$ ).
- Diminui (Atenua) a expressão gênica das subunidades  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$  dos nAChRs.
- Aumenta a expressão gênica da subunidade  $\epsilon$  dos nAChRs.
- Diminui (Atenua) a expressão gênica da Miogenina (dados não significativos estatisticamente).
- Aumenta a expressão gênica da MyoD (dados não significativos estatisticamente).
- Diminui (Atenua) a expressão protéica da subunidade  $\alpha$  dos nAChRs.
- Aumenta a expressão protéica da subunidade  $\epsilon$  dos nAChRs.



- Diminui (Atenua) a expressão protéica da Miogenina comparado ao grupo EAo (dados não significativos estatisticamente).
- Aumenta a expressão protéica a MyoD comparado ao grupo EAo (dados não significativos estatisticamente).