

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

“Expressão gênica dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) e caracterização morfológica das junções neuromusculares em músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca”

PAULA AIELLO TOMÉ DE SOUZA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
da Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu
para obtenção do Título de Bacharelado
em Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maéli Dal pai Silva

BOTUCATU

2009

PAULA AIELLO TOMÉ DE SOUZA

“Expressão Gênica dos Receptores Nicotínicos de Acetilcolina (nAChR) e Caracterização Morfológica das Junções Neuromusculares em músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca”

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
da Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu para
obtenção do Título de Bacharelado
em Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maeli Dal pai Silva

BOTUCATU
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Souza, Paula Aiello Tomé de.

Expressão gênica dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) e
caracterização morfológica das junções neuromusculares em músculo
esquelético de ratos com insuficiência cardíaca / Paula Aiello Tomé de Souza.
– Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Selma Maria Michelin Matheus

Co-orientadora: Maeli Dal Pai Silva

1. Insuficiência cardíaca 2. Expressão gênica

Palavras-chave: Expressão gênica; Insuficiência cardíaca; Junção neuromus-
cular; Músculo sóleo

**"Deus não manda coisas impossíveis, mas sim, ao mandar o que manda, convida-te a fazer o que possas e pedir o que não possas e te ajuda para que possas."
Santo Agostinho de Hipona**

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, meu Senhor o qual me capacitou e fortaleceu.

À meus pais Aparecida e José Moacir , irmão Tiago pelos sinceros momentos de ânimo, força e amor sem igual.

Por toda a confiança que depositaram em mim durante os anos de minha graduação.

A professora e amiga Dra.Selma por compartilhar momentos importantes na minha vida e por acreditar neste trabalho.
Pela oportunidade oferecida com entusiasmo e determinação.

A professora e amiga Dra. Maeli pela oportunidade e confiança depositada em mim, pelo otimismo e profundidade de sua orientação.

Aos meus amigos MUR que puderam saborear comigo a vitória desta conclusão de curso.

Aos funcionários do laboratório com sua alegria constante e auxílio.

Aos amigos da pós-graduação dividindo os conhecimentos adquiridos.

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) está associada à miopatia dos músculos esqueléticos com aumento da expressão das isoformas rápidas da cadeia pesada de miosina e alterações na matriz extracelular. Os fatores de regulação miogênica (MRF), como a MyoD e MRF4, pertencem a uma família de fatores transcricionais que controlam vários genes músculo-específicos. Esses fatores forma heterodímeros com proteínas HLH e ligam-se a seqüências de DNA conhecidas como Ebox, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, incluindo todos aqueles que codificam as subunidades dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da junção neuromuscular (JNM). Baseado no fato de que na IC há uma diminuição na expressão da MyoD e MRF4 no músculo sóleo de ratos com IC induzida por monocrotalina, o objetivo do presente trabalho é verificar possíveis alterações na expressão dos receptores de acetilcolina, bem como realizar uma análise morfológica e morfométrica das JNMs. Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, divididos em grupos controle e experimental e a Insuficiência cardíaca (IC) foi induzida pela injeção de monocrotalina intra-peritoneal. Quando os sintomas de IC foram visualizados (após 22 dias) os animais foram sacrificados com pentobarbital sódico i.p. (50 mg/Kg). A seguir foram mensurados o peso corporal (PC) dos ratos, bem como outros parâmetros. O músculo sóleo de ambos os antímeros foram dissecados e preparados para: avaliação da expressão gênica das subunidades ϵ , γ e α dos receptores de acetilcolina por PCR em Tempo Real; para análise morfológica e morfométrica da Junção Neuromuscular através da técnica de Esterase inespecífica; para análise ultra-estrutural da JN. Os resultados indicam que não houveram alterações morfológicas e morfométricas na JN, mas houve um aumento da expressão da subunidade alpha dos receptores de acetilcolina nos animais com IC. Desse modo podemos inferir que o aumento da expressão da subunidade alpha pode estar relacionado a uma tentativa da fibra muscular em manter sua atividade normal, tendo em vista que a subunidade alpha possui o sítio de ligação com o neurotransmissor, promovendo abertura do canal iônico, que desencadeia a contração muscular.

Palavras-chave: junção neuromuscular, insuficiência cardíaca, expressão gênica, músculo sóleo

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO	
Junção Neuromuscular.....	7
Insuficiência Cardíaca.....	10
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODO	
Animais e protocolo experimental.....	12
Coleta das amostras musculares.....	12
Metodologia para grupo I.....	14
Metodologia para grupo II.....	19
4.RESULTADOS	
Resultados para grupo I.....	21
Resultados para grupo II.....	29
5.DISSCUSSÃO e CONCLUSÃO.....	37
7.REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

Junção Neuromuscular

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, 1994). Na região de contato, o potencial de ação do nervo ocasiona a liberação de um transmissor químico, a acetilcolina, que atua na membrana da fibra muscular para iniciar um potencial de ação (WALTON, 1988).

O número e posição da JNM na fibra muscular, a configuração da terminação nervosa na JNM e a complexidade da região pós-sináptica podem variar de acordo com o filo e a espécie animal, entre diferentes músculos em uma mesma espécie e, entre diferentes fibras de um determinado músculo segundo ENGEL (1994).

Apesar de algumas variações que possam existir na morfologia das JNMs elas possuem três compartimentos: o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes a terminação nervosa e a célula de Schwann terminal; o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal juncional; e o compartimento pós-sináptico, que compreende o sinuoso sarcolema juncional que apresenta as dobras juncionais e o sarcoplasma juncional que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica (ENGEL, 1994).

Profundamente à membrana pós-sináptica há um aglomerado de núcleos sinápticos que são morfologicamente diferentes dos não sinápticos, pois são maiores e seus genes transcrevem proteínas encontradas apenas na membrana sarcoplasmática sináptica (transcrição do RNAm das subunidades de AChR, mitocôndrias, REL, RER, Complexo de Golgi) (RUFF,2003, HALL; SANES, 1993).

Nas dobras juncionais estão presentes duas regiões distintas: o ápice, onde os receptores de acetilcolina (AChRs) estão agrupados em uma densidade de aproximadamente $10^4/\mu\text{m}^2$ e o fundo das dobras, onde estão os canais de sódio responsáveis pela geração do potencial de ação (RUFF, 2003). Os AChRs possuem forma de rosácea (CHANGEUX; EDELSTEIN,1998) e são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos, que se abrem quando a acetilcolina liga-se a eles, sendo responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (HALL; SANES, 1993). Existem duas formas de receptores: uma forma extrajuncional imatura, presente na fibra embrionária ou na fibra desnervada, composta pelas subunidades α_2 , β , δ e γ (γ AChR); e a forma juncional madura, presente na JNM da fibra inervada, consistindo das subunidades α_2 , β , δ e ϵ (ϵ AChR) (figura 1) (SHUETZE; ROLE, 1987, SHAKMAN; BRENNER, 1978, MISHINA et al., 1986).

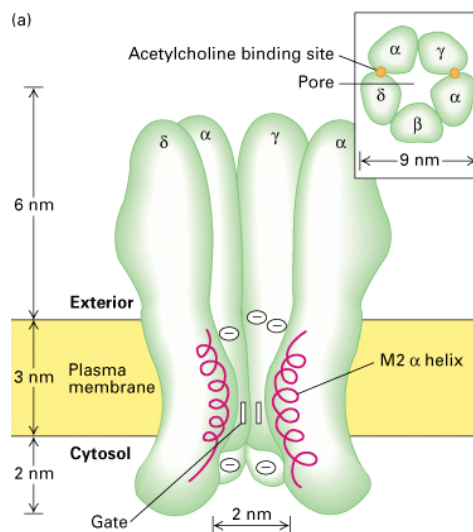


Figura 2: Modelo tridimensional das subunidades α_2, β, δ e γ de receptores fetais de ACh. Na NMJ adulta a subunidade γ , é substituída pela subunidade ϵ (<http://www.coloradocollege.edu/idprog/Neuroscience/Cellular%20slides/nACh%20receptor.GIF>).

Durante a embriogênese, antes que o processo de inervação tenha ocorrido, a subunidade γ AChR está distribuída difusamente sobre a superfície das fibras

musculares, durante a formação inicial da sinapse, essa subunidade está concentrada na NMJ e desaparece dos sítios extra-juncionais (ENGEL,1994). Em ratos, nos primeiros 14 dias de vida, a subunidade γ AChR é substituída pelo ϵ AChR na NMJ (SHAKMAN; BRENNER,1978, MISHINA et al,1986, SCHUETZE; ROLE, 1987). Em camundongos que geneticamente não expressam MyoD, a transição dos tipos fetais de AchRs para os tipos adultos é diminuída (WANG et al., 2003). Essa modulação das subunidades ocorre sob a influência neural e a regulação da expressão diferencial dos genes das subunidades de AChR é mediada pelos MRFs (WANG et al., 2003). Segundo Charbonnier et al. (2003), durante o desenvolvimento de *Xenopus*, o Myf-5 induz especificamente a produção de AchR δ , enquanto que MyoD e MRF4 induzem a expressão gênica da subunidade γ AChR mas não da subunidade δ AchR.

As JNMs são passíveis de remodelações devido a diversos fatores: idade (ANDONIAN; FAHIM, 1987; BARKER; I.P, 1965; FAHIM, 1997; PRZYBYLA, 2005), compressões, esmagamentos e secções traumáticas de nervos periféricos (GATTUSO et al., 1988), grau de atividade (DESCHENES, 1993; FAHIM, 1997; FAHIM; ROBBINS, 1986) e algumas patologias (KALAMIDA et al., 2007, MAHADEVA et al., 2008).

Alterações na estrutura da junção neuromuscular podem estar relacionadas com alterações no seu tamanho (ANDONIAN, 1988; WAERHAUG, 1992; DESCHENES, 1993), comprimento (WAERHAUG, 1992; FAHIN, 1997), e dispersão das vesículas sinápticas e receptores (DESAULNIERS, 1998; DESCHENES, 2000).

Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma dessas condições patológicas que induz adaptações qualitativas e quantitativas nas propriedades do músculo esquelético. Essa patologia constitui um importante problema clínico devido à gravidade de suas manifestações e a sua prevalência. Estima-se que existe por volta de 23 milhões de portadores em todo o mundo, com dois milhões de novos casos surgindo a cada ano (MADY, 2007). 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 encontra-se entre as principais causas de internação do Sistema Único de Saúde (ALBANESI FILHO, 2005). De acordo com o IBGE, a população em 2007 será de quase 190 milhões de habitantes, sete milhões dos quais portadores dessa síndrome. O número de novos pacientes vem crescendo, apesar dos avanços cada vez maiores adquiridos no tratamento (MADY, 2007).

Entre os principais sintomas dos pacientes com IC encontram-se a fadiga e a fraqueza muscular (POOLE-WILSON; FERRARI, 1996; WILSON, 1996; BIGARD et al., 1998). Esse fenômeno é decorrente, em parte, da presença de alterações nos tipos de fibras musculares (LIPKIN et al., 1988; SULLIVAN et al., 1990; MANCINI et al., 1992; DE SOUSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2003) e da mudança no metabolismo de oxidativo para glicolítico (VESCOVO et al., 1998). 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 et al., 1996; DE SOUZA et al., 2000; VESCOVO et al., 1998; DALLA LIBERA et al., 1999; CARVALHO et al., 2003; CARVALHO et al., 2005) e em pacientes com essa síndrome (MANCINI et al., 1992; HARRINGTON et al., 1997; TOTH et al., 1997; POEHLMAN, 1999; ANKER et al., 2003). Os mecanismos responsáveis por essas alterações do músculo esquelético na IC não estão completamente definidos. É provável que os fatores de transcrição pertencentes à família “basic

helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf-5 e o MRF4, conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs), sejam responsáveis. Na miogênese, esses fatores transcricionais músculo-específicos regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas. A MyoD e a Myf-5 são expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, enquanto que a Miogenina e o MRF4 são expressos em células no final da fase de diferenciação (MEGENEY; RUDNICKI, 1995). Esses fatores formam heterodímeros com proteínas HLH e ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como E-box, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, incluindo todos aqueles que codificam as subunidades dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da junção neuromuscular (JNM) (PIETTE et al., 1990; GILMOUR et al., 1991; NUMBERGER et al., 1991; PRODY; MERLIE, 1991; SIMON; BURDEN, 1993, LIU et al., 2000).

A manutenção, funcionamento e regeneração dos músculos esqueléticos dependem da integridade da junção neuromuscular, aumentando a importância do conhecimento da sua organização estrutural, arquitetura molecular e funções (SANES; LICHTMAN, 1999; KOIRALA et al., 2003)

Levando-se em conta que o músculo esquelético possui uma alta plasticidade, podendo alterar sua matriz extracelular e suas características morfológicas, metabólicas, contráteis e funcionais de suas fibras musculares em diversas patologias (DAL PAI SILVA et al., 2005), alterações que acometem a junção neuromuscular acabam interferindo na ação muscular.

2. OBJETIVO:

Verificar se a Insuficiência Cardíaca promove alterações:

- na morfologia da junção neuromuscular (microscopia óptica, morfometria e ultraestrutura).

- na expressão gênica das subunidades AChR γ , AchR α , e AchR ϵ dos receptores nicotínicos de acetilcolina

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Protocolo Experimental

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal de 70 a 100 g, provenientes do Biotério Central - UNESP - Campus de Botucatu - SP. A Hipertrofia Ventricular Direita (HVD) e a Insuficiência Cardíaca (IC) foram induzidas pela injeção de monocrotalina (C 2401 - Sigma), que induz severa hipertensão arterial pulmonar, seguida de HVD e IC, sem acarretar, per si, alterações na musculatura esquelética (REINDEL et al., 1990; VESCOVO et al., 1998).

3.2. Coleta das Amostras Musculares

Foram utilizados dois grupos experimentais.

Grupo I para expressão gênica

Grupo IC – animais com insuficiência cardíaca (n=10);

Grupo CT – animais controles da insuficiência cardíaca (n=8).

Grupo II para Morfologia e Ultraestrutura.

Grupo IC – animais com insuficiência cardíaca (n=10);

Grupo CT – animais controles da insuficiência cardíaca (n=10).

A monocrotalina foi injetada intraperitonealmente numa única dose (30 mg/kg i.p.) dentro dos dois grupos. Esses animais receberam ração e água *ad*

libitum. No grupo CT, foi injetada solução salina e esses receberam a mesma quantidade de ração consumida, no dia anterior, pelo grupo IC.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12 horas, no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica – FMB – UNESP – Botucatu.

Os animais foram observados diariamente para a detecção dos sinais compatíveis com o diagnóstico clínico de IC, como taquipnéia. A presença de IC foi confirmada, no sacrifício dos ratos, pelo encontro de derrame pleural, ascite, trombo em átrio direito e hipertrofia do ventrículo direito (DALLA LIBERA et al., 1999). Quando os sintomas de IC foram visualizados, o que ocorre neste modelo aproximadamente após 22 dias da injeção de monocrotalina, todos os animais foram sacrificados mediante anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/Kg). Em seguida, foi mensurado o peso corporal (PC) dos ratos.

Os ventrículos esquerdos e direito foram dissecados e pesados separadamente. As relações entre os pesos do ventrículo esquerdo (VE) e direito (VD) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (VE/PC e VD/PC) foram utilizadas como índices de hipertrofia dos ventrículos (VESCOVO et al., 1998), a relação entre o peso do Sóleo (Sol) sobre o peso corporal (PC) dos ratos (Sol/PC) foi utilizada como índice de atrofia da musculatura esquelética. No grupo I – o antímero direito foi utilizado para mensuração do peso corporal e o antímero esquerdo foi utilizado para expressão gênica. No grupo II, o antímero direito foi utilizado para mensuração do peso e a seguir foi fixado em glutaraldeído para posterior marcação das JNM com reação de esterase inespecífica e morfometria, os músculos do antímero esquerdo foram processados para análise ultraestrutural.

3.3. Metodologia para Grupo I

A. Extração do RNA

Extração do RNA com TRIzol (Invitrogen)

a) Homogeneização

Os músculos sóleos esquerdos após retirada foram congelados em nitrogênio líquido do grupo IC (n=10) e do grupo CT (n=8) foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos.

b) Fase de separação

Foram acrescentados 200 µl de clorofórmio em cada amostra, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando por três minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O RNA permaneceu na fase aquosa.

c) Precipitação do RNA

A fase aquosa formada após a centrifugação do material, foi transferida para um segundo tubo autoclavado. O RNA foi precipitado por intermédio da incubação com 500 µl de álcool isopropílico, por mL de TRIzol utilizado inicialmente, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado de RNA, invisível antes dessa centrifugação, formou um pellet no fundo de tubo.

d) Lavagem do RNA

O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet formado foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. Em seguida, esse sedimento de RNA formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) a 4°C e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C.

e) Redissolvendo o RNA

O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,01%), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase e, finalmente, armazenado em freezer à - 80°C.

O RNA total, extraído dos grupos IC e CT, foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). Foi também determinada a razão entre 260 e 280 nm, o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão ≥ 1.4).

B. Gel Analítico de Agarose para RNA

A qualidade (integridade) do RNA extraído dos grupos IC e CT foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato e 1mM de EDTA 0,5M a pH=8,0).

Em seguida, foi aplicado no gel 1 μ l da solução contendo o RNA total (20 μ l) diluído em 4 μ l de corante Orange. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 70 mV durante 60 minutos, sob agitação do tampão TAE 1X, pH 8.0, para manutenção do pH. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com SYBR Safe (Invitrogen) durante 40 minutos.

C. Desenho e Diluição de Primers

Os primers, utilizados para a amplificação do cDNA, foram construídos a partir da seqüência codificante do RNAm das subunidades descrita em espécies de *rattus norvegicus* Utilizando-se o banco de dados GenBank, foram obtidas seqüências dos RNAm das seguintes subunidades: sub gamma, alpha e epsilon.

Para cada uma dessas subunidades foram desenhados um primer senso e um antisenso, utilizando-se o programa computacional Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Os primers foram sintetizados comercialmente (Invitrogen) e diluídos em água livre de DNase e RNase (Gibco) para uma concentração final de 100 µM.

Os primers senso e antisenso utilizados para a amplificação do cDNA do gene estudado, pode ser observado, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados na padronização da RT-PCR para os genes das subunidades dos nAChR estudados.

Gene	Nº de Acesso no GenBank	Seqüência do primer (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)
Gamma 1	NM_019145	F: CCACCAGAAGGTGGTGTCT R: TGAGGAGATGAGCACACAGG	91
Gamma 2	X06364	F: AACGCAAGCCCCTCTTCTAT R: GAGGATCGCAACTGAGGAGA	91
Alpha 1	NM_024485	F: TCCCTTCGATGAGCAGAACT R: AGCCGTCATAGGTCCAAGTG	56
Epsilon 1	NM_017194	F: GGCTCAACTTCAGCAAGGAC R: AGCCATACATGTTTCGGAAGG	70
Epsilon 2	X06365	F: GACTACTGCCAGGCATGAT R: TTCTCCAGGGTCTTCTGTGG	60

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

D. Tratamento do RNA com DNase

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

No projeto inicial, foi proposta a análise da expressão gênica dos nAChR por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-PCR). No entanto, o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, adquiriu o equipamento para a realização do RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR) (FAPESP, Proc. 06/54419-9). Desta forma, foi realizada a análise da expressão quantitativa das subunidades dos nAChR no músculo sóleo.

E. Reação de Transcrição Reversa (RT) do RNA

A transcrição reversa (RT) do RNA total, extraído do músculo sóleo, foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com de 2 μ g de RNA total obtido do músculo esquelético, ao qual foi adicionado 10 μ l de tampão de transcriptase reversa (10 x RT buffer), 4 μ L de dNTP (25 x), 10 μ L de *Randon Primers* (10 x), 2,5 μ L de enzima de transcriptase reversa (50 unidades/ μ l), 2,5 μ L de inibidor de ribonuclease recombinante *RNaseOUT* (40 unidades/ μ L) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 μ L H₂O livre de RNases. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos e em seguida, por 42 °C por duas horas e, em seguida, o volume final do produto da RT ajustado para 200 μ L.

F. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real

A PCR em Tempo Real foi realizada com o Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 3 µL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de Power SYBR® Green Mix (2,5 x) e 400 nM de cada primer, em um volume final de 25 µL. Os primers para os genes analisados (Tabela 1) foram obtidos através do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) e, sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente foram diluídos em água livre de DNase e RNase (Gibco) para uma concentração final de 5 µM.

A reação para cada gene foi realizada em duplicatas, no Sistema Real Time PCR 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se os seguintes parâmetros: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Para cada amostra, foi plotado um gráfico de amplificação mostrando o aumento da fluorescência do SYBR® Green (ΔRn) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*cycle threshold* - C_T), utilizando-se o software 7300 System SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) pelo método da segunda derivada máxima. Curvas padrões relativas para cada gene foram plotadas tendo o C_T (eixo y) versus o *log* de uma série de sete diluições (2x) de uma mistura inicial contendo quantidades iguais de cDNA de todas as amostras (eixo x). A inclinação de uma curva-padrão (*a*) descreve a eficiência da PCR e, é definida pela equação: $C_T = a (\log Q) + b$, onde C_T é o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (*cycle threshold* - C_T), *Q* é a quantidade inicial e *b* é a interseção do

eixo y. Quando a amplificação da PCR possui 100 % de eficiência, resultando no dobro do produto a cada ciclo, a inclinação será -3,32 (MEDHURST et al., 2000). Para garantir a qualidade das medidas, cada placa de PCR incluía duas curvas-padrão, uma para o gene alvo e outra para a referência endógena (TBP), um controle negativo da PCR (amostra substituída por água livre de RNase) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). O TBP foi utilizado como controle interno, para verificar a integridade das amostras que foram amplificadas.

3.4. Metodologia para Grupo II

Os músculos do antímero direito foram utilizados para mensuração do peso e posteriormente foram fixados em glutaraldeído para posterior reação de Esterase Inespecífica, onde as JNMs foram marcadas e a seguir submetidas à análise morfométrica. Os músculos do antímero esquerdo foram imediatamente fixados em glutaraldeído e processados para análise ultraestrutural.

A. Microscopia de luz e morfometria das JNM

Após retirada dos músculos sóleos estes foram cortados longitudinalmente em 3 ou 4 fatias. A seguir o material foi submetido à reação de Esterase Inespecífica, para caracterização das JNM, preconizada por LEHRER; ORNSTEIN (1959).

Técnica de Esterase Inespecífica (LEHRER; ORNSTEIN, 1959)

- Lavar as peças durante 1 minuto em tampão fosfato 0,1M pH 7,4
- Incubar as porções musculares a 37°C durante 5-10 minutos, no seguinte meio:

Solução Tris HCl – 20ml (Tris aminometano 6,05g + ácido clorídrico concentrado 3,34ml + água destilada 100ml)

Alfa naftil acetato a 1% - 0,5 ml (alfa naftil 1,0g + acetona 100ml)

Pararosanilina Azotizada – 1,6ml (pararosanilina* 0,8ml + nitrito de sódio à 4% 0,8ml)

*Solução estoque de Pararosanilina:

pararosanilina.....1,0ml
água destilada.....20,0ml
ácido clorídrico concentrado.....5,0ml

Aquecer, resfriar e filtrar

- Ajustar pH entre 6,8-7,2
- Lavar em água corrente durante 5 minutos
- Desidratar, diafanizar e montar

B. Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica foram utilizadas as lâminas preparadas para o estudo da morfologia das junções neuromusculares. Para cada animal estudado foram tomadas medidas do diâmetro máximo de 50 junções. Essa análise foi realizada através de Sistema de Análise de Imagens Computadorizado (KS300 Zeiss) utilizando-se um programa do analisador de imagens (Axionvision 4.0). Os dados obtidos serão submetidos à análise estatística (5% de significância).

C. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para este estudo os músculos do antímero esquerdo depois de dissecados e removidos, foram cortados transversalmente eliminando-se as extremidades: origem e inserção. A seguir, a porção muscular contendo o ponto motor foi novamente seccionada no sentido longitudinal. Esses fragmentos foram então imersos na solução fixadora e submetidos à técnica de rotina para MET. Os tecidos foram incluídos de modo que se obtenham cortes transversais dos músculos com a finalidade de se identificarem as junções neuromusculares.

Após inclusão em araldite, cortes ultrafinos foram obtidos, examinados e documentados em microscópio eletrônico de transmissão Philips (modelo CM100 FEI).

3.5. Análise Estatística dos Dados

Todos os dados referentes aos parâmetros anatômicos e morfometria estão apresentados como média \pm erro padrão (EP). Para a comparação dos resultados entre grupos experimentais foi utilizado o teste *t* de Student (ZAR,1999). Uma diferença de 5% foi considerada estatisticamente significativa.

Os dados referentes ao PCR em tempo Real estão apresentados como mediana e valores mínimo e máximo das expressões. Para a comparação dos resultados segundo grupo e método entre os grupos experimentais foram utilizados o teste da análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes (ZAR, 1999).

3.6. Resultados para grupo I

A. Dados Anatômicos

- Presença de insuficiência cardíaca nos ratos tratados com monocrotalina referentes à Tabela 2.

Após 22 dias, todos os ratos tratados com monocrotalina (MCT) apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (IC) após serem sacrificados, confirmados pela hipertrofia dos átrios e do ventrículo direito, efusão pleural e pericárdica, taquipnéia e fígado congesto. Nenhuma alteração foi encontrada nos animais controle (CT).

Não houve diferença significativa no peso corpóreo (PC) entre os grupos controle (CT) e tratado (IC). O peso do coração aumentou no grupo IC,

comparado com o grupo CT, como demonstrado pelo peso do ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e átrio (AT). Os índices de hipertrofia do coração observados pela relação VE/PC, VD/PC, AT/PC apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais estudados.

Tabela 2: Dados anatômicos dos grupos CT e IC.

	<i>Grupos Experimentais</i>	
	CT (n=8)	IC (n=10)
PC (g)	151,91 ± 8,89	157,79 ± 16,88 +++
VE (g)	0,39± 0,036	0,48 ± 0,084 *
VD (g)	0,13 ± 0,013	0,36 ± 0,050 ++
AT (g)	0,06 ± 0,0051	0,14 ± 0,0291 ++
VE/PC (mg/g)	2,6 ± 0,0001	3,1 ± 0,0004 +
VD/PC (mg/g)	0,9 ± 0,0001	2,3 ± 0,0004 ++
AT/PC (mg/g)	0,4 ± 0,0001	0,9 ± 0,0003 ++
Sóleo Direito (g)	0,08 ± 0,014	0,09 ± 0,016 +++
Sol/PC (g)	0,00053 ± 0,00008	0,00058 ± 0,00009+++

Valores estão expressos como média ± EP; n, número de animais; CT: grupo controle; IC: grupo insuficiência cardíaca; PC: peso corpóreo; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso dos átrios e, Sóleo Direito: peso do músculo Sóleo Direito.

* p<0.01, + p<0.005, ++ p<0.001,,: estatisticamente significativo versus grupo controle. +++ p >0,05: estatisticamente não significativo versus grupo controle.

➤ Peso e índice de atrofia do músculo Sóleo referentes à Tabela 2.

O músculo Sóleo direito, bem como a relação Sóleo/PC quando comparado entre os grupos CT e IC não apresentaram diferença.

B. Análise da expressão gênica das subunidades dos nAChR

Análise da extração do RNA total com Trizol

Os dados referentes à quantificação do RNA por espectrofotometria, a 260 nm, que nos mostrou a quantidade de RNA e a razão entre 260/280 nm, que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão > 1,4), estão expostos na Tabela 3. A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de razão $260/280 \geq 1,4$.

A concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em cada amostra foi calculada pela seguinte expressão matemática: $40 \times 70 \times \text{Absorbância a } 260 \text{ nm}$. O valor 40 indica que para cada unidade de absorbância há 40 ng de RNA; o valor 70 indica o volume de solução de RNA quantificado.

Tabela 3. Resultado da espectrofotometria para estimativa da qualidade e da quantidade do RNA total isolado do músculo Sóleo de ratos Wistar

<i>Grupo</i>	<i>Amostra</i>	<i>260 nm</i>	<i>280 nm</i>	<i>Razão 260 nm/280 nm</i>	<i>[µg/µL]</i>
Controle	01	0,384	0,261	1,471	1,7520
	02	0,434	0,278	1,573	1,2152
	03	0,355	0,214	1,659	0,9940
	04	0,332	0,185	1,795	0,9296
	05	0,129	0,072	1,792	0,3612
	06	0,45	0,218	2,064	1,2600
	07	0,337	0,134	2,515	0,9436
	08	0,309	0,123	2,512	0,8652
Insuficiência Cardíaca	04	0,305	0,160	1,906	0,8540
	06	0,880	0,125	1,504	2,4640
	07	0,511	0,277	1,845	1,4308
	11	0,397	0,255	1,557	1,1116
	13	0,238	0,134	1,776	0,6664
	17	0,678	0,416	1,630	1,8984
	18	0,247	0,104	2,375	0,6916
	20	0,416	0,292	1,425	1,1648
	21	0,323	0,139	2,324	0,9044
	22	0,193	0,085	2,271	0,5404

Após a eletroforese em gel de agarose (1%) da solução contendo o RNA total de cada amostra dos animais dos grupos estudados, a integridade do RNA extraído foi constatada pela presença das bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S. A eletroforese do Grupo CT está apresentada na figura 3. A eletroforese do grupo IC está apresentada na figura 4.

Figura 3. Gel ilustrativo de agarose a 1 %, demonstrando a qualidade da extração do grupo CT, constatada pela integridade das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. L: Padrão de peso molecular conhecido (Ladder).

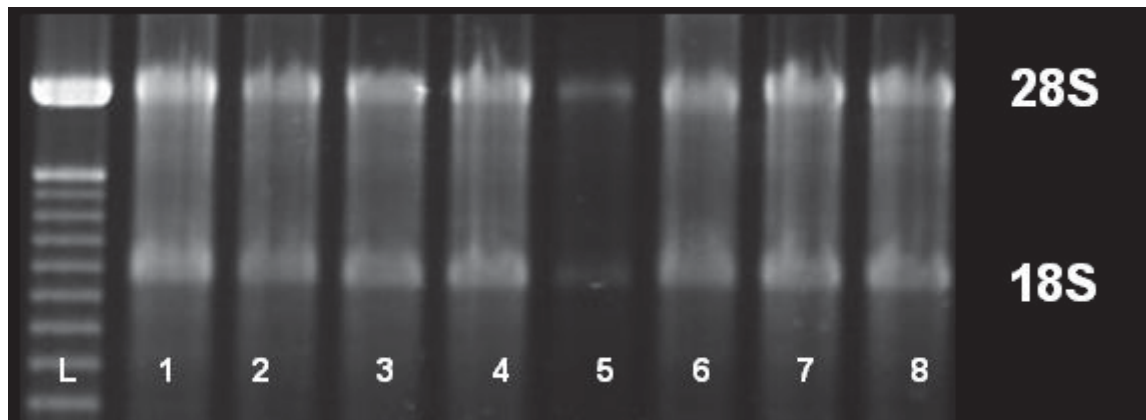
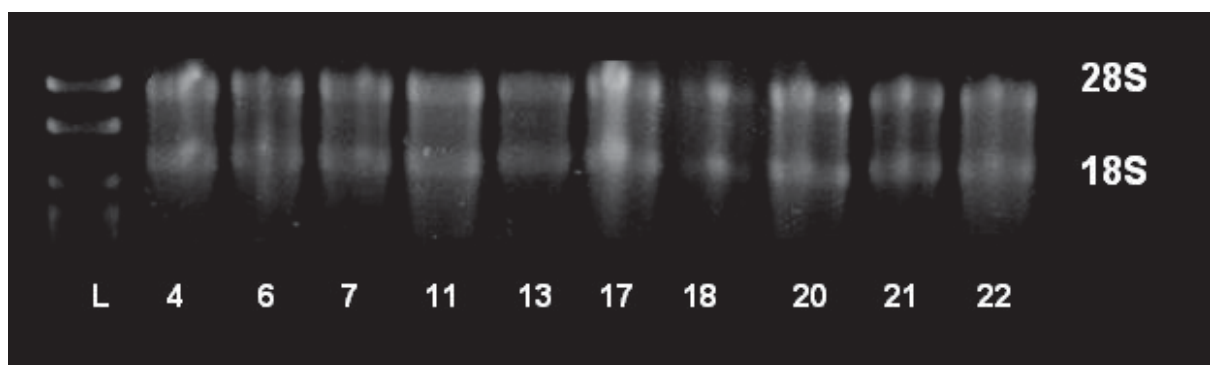


Figura 4. Gel de agarose a 1 %, demonstrando a qualidade da extração do grupo IC, constatada pela integridade das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. L: Padrão de peso molecular conhecido (Ladder).



Especificidade dos primers

As seqüências dos primers estão representadas na Tabela 1. Todos os primers foram testados. Os produtos da PCR dos genes gamma I, gamma II,

alpha, epsilon I e epsilon II foram observados através do pico presente na curva de dissociação.

A análise da curva de dissociação permite não apenas a identificação do produto esperado, como também a distinção entre o DNA alvo e a formação de dímeros de primers.

Quantificação e normalização

A exatidão da quantificação do RNA mensageiro depende da linearidade e eficiência da amplificação da PCR, a qual pode ser determinada por dois métodos: a análise da curva padrão e o C_T comparativo (WONG; MEDRANO, 2005).

Análise da curva padrão

Nós constituímos uma série de 5 diluições (1:10) a partir de uma mistura inicial contendo quantidades iguais de cDNA de todas as amostras, gerando assim 5 pontos de uma curva padrão, para cada um dos conjuntos de primers escolhidos inicialmente para a RT-PCR em tempo real. A linearidade e a eficiência da PCR em tempo real foram deduzidas a partir da inclinação da curva-padrão gerada pelo software 7300 System SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada um dos genes analisados. A análise de todas as curvas-padrão demonstrou uma alta linearidade ($r^2 = 0,99$). A eficiência da PCR (E_x) foi calculada a partir da equação $E_x = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$. Uma inclinação de -3,32 implicarão numa eficiência de reação de 100%. Todos os genes apresentaram uma eficiência entre 99,8% e 100,8%. Os valores de inclinação foram: Gamma I (-3,97), Gamma II (-3,80), Alpha (-3,63), Epsilon I (-3,37), Epsilon II (-3,78). Uma quantificação de confiança requer a correção da variabilidade experimental entre as diferentes amostras, por exemplo, quantidade de RNA e eficiência da reação de transcrição reversa. A normalização por um gene constitutivo é o método mais aceito para evitar essas

disparidades (GIULIETTI et al., 2001, RADONIC et al., 2004). A escolha de um gene apropriado é crucial para confiabilidade dos resultados, porém o nível de expressão desse gene deve permanecer inalterado durante diferentes condições experimentais (ALWAY et al., 2002, SANCHEZ et al., 2006). Entretanto, essa normalização nem sempre é possível, pois podem não existir genes conhecidos para essa finalidade (DHEDA et al., 2004; NOLAN et al., 2006 e ELDSTRÖM et al., 2006). No presente experimento, testamos os genes constitutivos beta actina (ACTB), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) e Tata Box binding Protein (TBP). Os resultados referentes à expressão desses genes foram avaliados pelo software GENORM para estabelecer os genes para normalização, como descrito por VANDESOMPELE et al., 2002.

Método do C_T comparativo (Método do ΔC_T)

Após a análise das curvas-padrão e da eficiência da reação de PCR para cada gene, foi verificada a possibilidade de validação do método do C_T comparativo, de acordo com o *User Bulletin #2* (Applied Biosystems). Essa é uma alternativa ao método da curva-padrão. O método do ΔC_T é um método simples e fácil de quantificação do RNA mensageiro, o qual é baseado na eficiência de amplificação entre os genes alvo e de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Porém, não foi possível validar nossos resultados pelo método ΔC_T .

Expressão gênica das subunidades dos receptores de Acetilcolina (Tabela 4)

Analisando-se a expressão gênica dos receptores de acetilcolina no músculo sóleo de ratos controle temos que, a subunidade epsilon I é mais expressa seguida pelas subunidades epsilon II, alpha, gama II, gama I (menos expressa).

Nos ratos com insuficiência cardíaca observamos que houve diferença significativa em relação à subunidade alpha, indicando que a insuficiência cardíaca promoveu um aumento da expressão do RNAm dessa subunidade no músculo sóleo de ratos.

Esse aumento de expressão da subunidade alpha é seguida pela subunidade epsilon I, epsilon II, gama I e gama II. Observa-se uma tendência de aumento em relação a subunidade epsilon I embora não sido estatisticamente significativa.

Comparando-se a expressão das subunidades de acetilcolina entre si (animais CT e IC) verificamos que a expressão das subunidades gama I e II, mas a expressão da subunidade alpha não difere significativamente da expressão da subunidade epsilon I e II. Ou seja, o padrão de expressão das subunidades se mantém nos animais controle e tratados.

Tabela 4: Mediana e valores mínimo e máximo das expressões segundo grupo e método. Letras maiúsculas: comparação de grupos fixado método. Letras minúsculas: comparação de métodos segundo grupo.

Grupo	Método				
	Gamma I	Gamma II	Alpha	Epsilon I	Epsilon II
IC	0,165	0,07	7,411	4,231	1,253
	(0,001-1,334)	(0,039-1,080)	(0,315-43,329)	0,012-10,637	(0,639-284,072)
	aA	aA	bB	aB	aB
CT	0,039	0,074	0,854	1,221	1,184
	(0,012-1,000)	(0,042-1,000)	(0,250-63,721)	(0,848-5,918)	(0,811-78,041)
	aA	aA	aB	aB	aB

3.7. Resultados para Grupo II

A. Dados Anatômicos

- Presença de insuficiência cardíaca nos ratos tratados com monocrotalina referentes a Tabela 5.

Após 22 dias, todos os ratos tratados com monocrotalina (MCT) apresentaram sinais de insuficiência cardíaca (IC) após serem sacrificados, confirmados pela hipertrofia dos átrios e do ventrículo direito, efusão pleural e pericárdica, taquipnéia e fígado congesto. Nenhuma alteração foi encontrada nos animais controle (CT).

Não houve diferença significativa no peso corpóreo (PC) entre os grupos controle (CT) e tratado (IC) conforme indicado na tabela 2. O peso do coração aumentou no grupo IC, comparado com o grupo CT, como demonstrado pelo peso do ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e átrio (AT). Os índices de hipertrofia do coração observados pela relação VE/PC, VD/PC, AT/PC apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais estudados.

- Peso e índice de atrofia do músculo Sóleo referentes a Tabela 5.

O músculo Sóleo esquerdo não apresentou diferença significativa indicando a presença de atrofia muscular. A relação Sóleo/PCF quando comparado entre os grupos CT e IC não apresentaram diferença significativa.

Tabela 5: Dados anatômicos dos grupos CT e IC

	<i>Grupos Experimentais</i>	
	CT (n=10)	IC (n=10)
PC (g)	148,039 ± 55,095*	146,529 ± 43,934*
VE (g)	0,434±0,046+	0,519±0,049
VD (g)	0,156±0,035+	0,384±0,042
AT (g)	0,073±0,016+	0,157±0,023
VE/PC (mg/g)	0,00249±0,00014+	0,00300±0,00036
VD/PC (mg/g)	0,00089±0,00013+	0,0022±0,00033
AT/PC (mg/g)	0,00042±0,000053+	0,000913±0,000184
Sóleo Direito (g)	0,0941±0,0183*	0,0872±0,0114
Sol/PC (g)	0,000536±0,000072*	0,000505±0,000081

Valores expressos como média ± desvio padrão. CT: grupo controle; IC: grupo insuficiência cardíaca; PCF: peso corpóreo final(g); VE: peso do ventrículo esquerdo(g); VE u/s: peso do ventrículo esquerdo relação úmido/seco(g); VD: peso do ventrículo direito(g); VD u/s: peso do ventrículo direito relação úmido/seco(g); AT: peso dos átrios(g); AT u/s: peso do átrio relação úmido/seco(g); SOL: peso do Sóleo Direito (mg). +p<0.001: estatisticamente significativo versus grupo controle, **p<0,05: estatisticamente significativo versus grupo controle, *p>0,05: estatisticamente não significativo versus grupo controle. Teste t Student para amostras independentes. * peso dos animais : p>0,05: estatisticamente não significativo versus grupo controle. Análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes

B. Microscopia de luz e morfometria das JNM

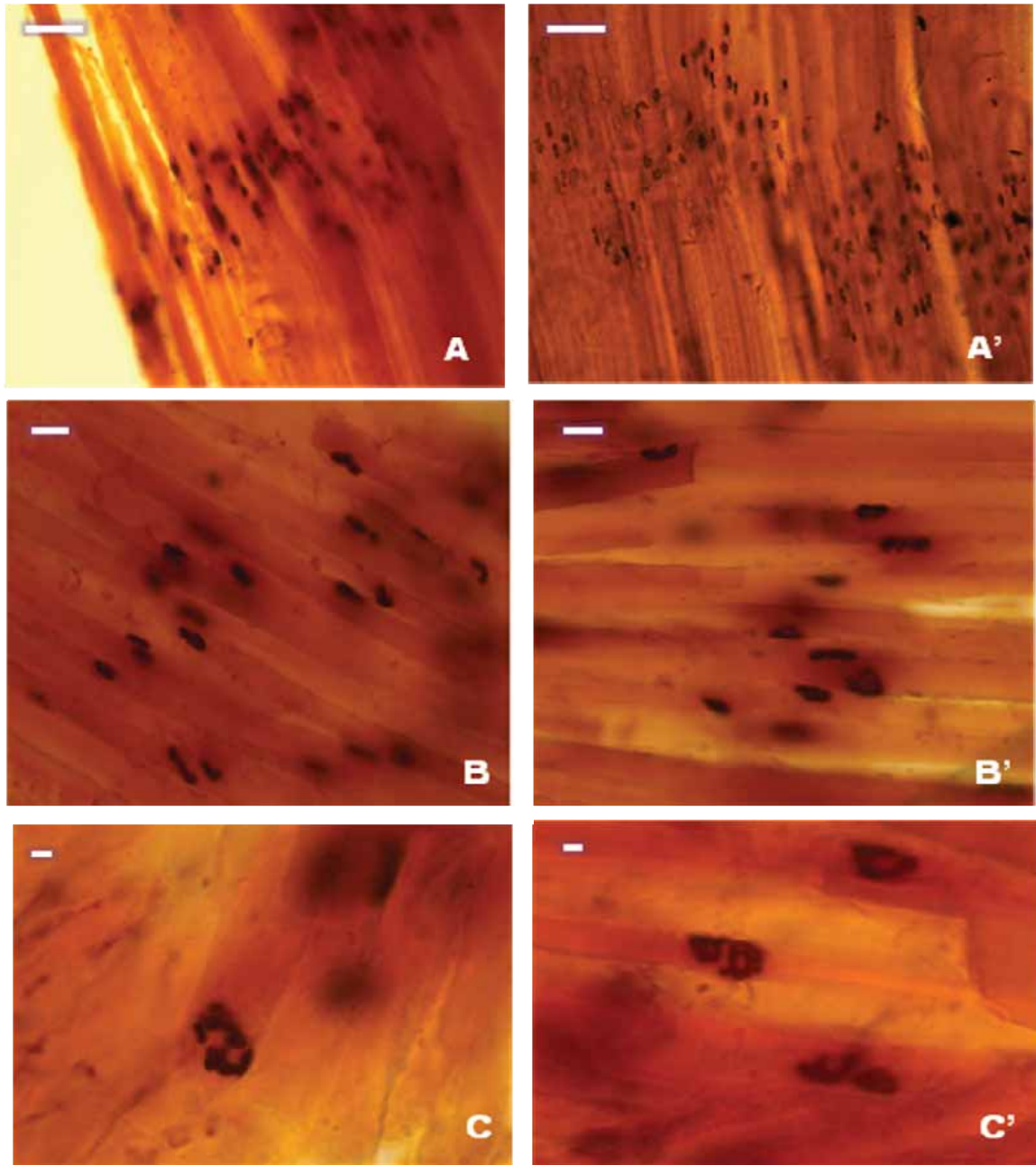
Através da técnica de esterase foi possível observar a distribuição das JNM no terço médio do músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca (Figura 5).

As JNMs estão alinhadas transversal ou obliquamente ao maior eixo do das fibras musculares, próximas aos ramos nervosos que levam os axônios para essas terminações. Essas junções se caracterizam por apresentar goteira sináptica bastante ramificada, larga e com estriações transversais que correspondem às dobras juncionais. Algumas formas caracterizam-se por apresentar menos ramificações e pequenas projeções terminais. Outras são pequenas com formato elíptico e aparência compacta. Formas intermediárias são observadas e algumas são difíceis de serem caracterizadas. Variações da forma (abertas, irregulares, compactas) caracterizam o polimorfismo dessas estruturas (Figura 6).

FIGURA 5: JNM no terço médio do músculo sóleo. Reação de Esterase Inespecífica. Montagem total.



FIGURA 6: JNMs marcadas pela reação de Esterase Inespecífica no músculo sóleo de animais controle (CT) e tratado (IC). Montagem total.



A: controle, escala de barra: 30 μm ; **A':** insuficiência cardíaca, escala de barra: 30 μm ; **B:** controle, escala de barra: 20 μm ; **B':** insuficiência cardíaca, escala de barra: 30 μm ; **C:** controle, escala de barra: 10 μm ; **C':** insuficiência cardíaca, escala de barra: 10 μm .

C. Análise Morfométrica

Após marcação das junções com Esterase Inespecífica foram realizadas medidas do diâmetro máximo de 50 JNMs de cada animal (N=20) de cada grupo estudado (CT= 10, IC=10). As medidas foram obtidas utilizando-se programa do analisador de imagens (Axionvision 4.0) acoplado ao microscópio KS300 Zeiss. Essa análise permitiu verificar que as JNMs do músculo SOL frente à insuficiência cardíaca não sofreram alteração em seu diâmetro (tabela 6).

Tabela 6: Média e desvio-padrão do diâmetro máximo das JNM (μm^2).

SÓLEO	IC (n=10)	CT (n=10)
	31,146 \pm 2,419*	31,110 \pm 2,096*

Diâmetro máximo das JNMs dos músculos Sóleo de animais controle (CT) e com insuficiência cardíaca (IC).
* $p > 0,05$ Estatisticamente não significativo se comparado o grupo CT com o grupo IC. Teste t Student para amostras independentes.

D. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Em nível ultraestrutural foi possível observar as características morfológicas das JNM presentes no músculo sóleo. O padrão morfológico das JNMs manteve-se semelhante nos grupos experimentais estudados (Figura 7) e (Figura 8).

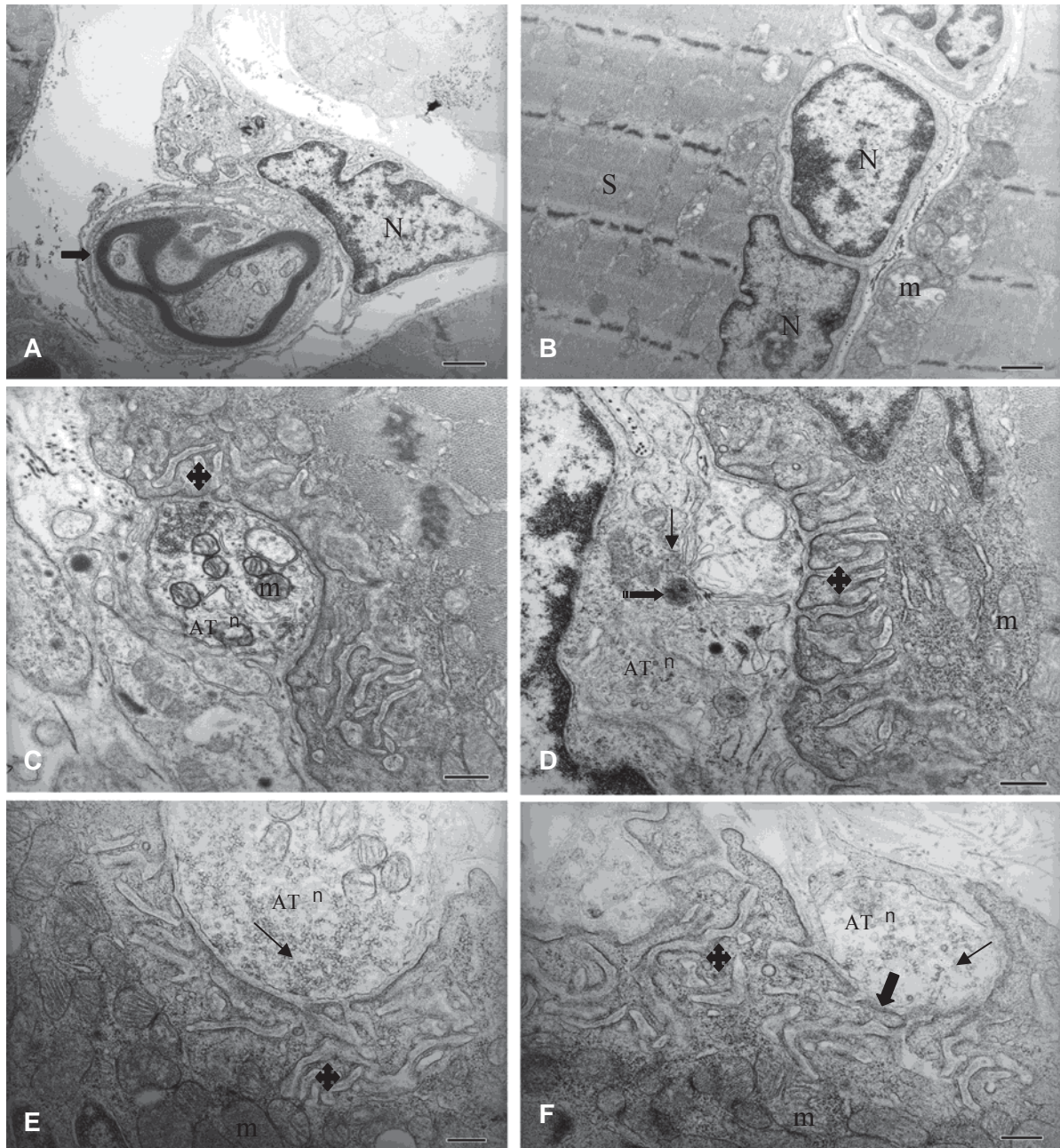
Em várias secções observou-se a presença de axônios mielinizados próximos à região da sinapse neuromuscular (figura 7 A). As fibras musculares em ambos os grupos estudados não apresentaram alterações morfológicas, onde

sarcômeros íntegros foram observados além de mitocôndrias intermiofibrilares e presença do núcleo fundamental (Figuras 7B e 8A).

As junções neuromusculares apresentaram-se caracterizadas por vários terminais axônicos, dispostos em goteiras sinápticas, ora mais rasas ora mais profundas (Figura 7 E, F). Os terminais axônicos apresentaram aparência normal, contendo muitas vesículas sinápticas, mitocôndrias e processos citoplasmáticos das Células de Schawnn, por vezes caracterizadas pela presença de seu núcleo sobre o terminal axônico (Figura 7 D). Nota-se ainda na figura 7 D a presença de corpo multivesicular, resultante da reabsorção do neurotransmissor. Chama atenção a observação de grande quantidade de vesículas sinápticas presentes em alguns terminais axônicos dos animais tratados (Figura 8 B, C). Muitas vezes observamos na membrana pré-sináptica a localização da zona ativa (local de exocitose das vesículas sinápticas) (Figuras 8C).

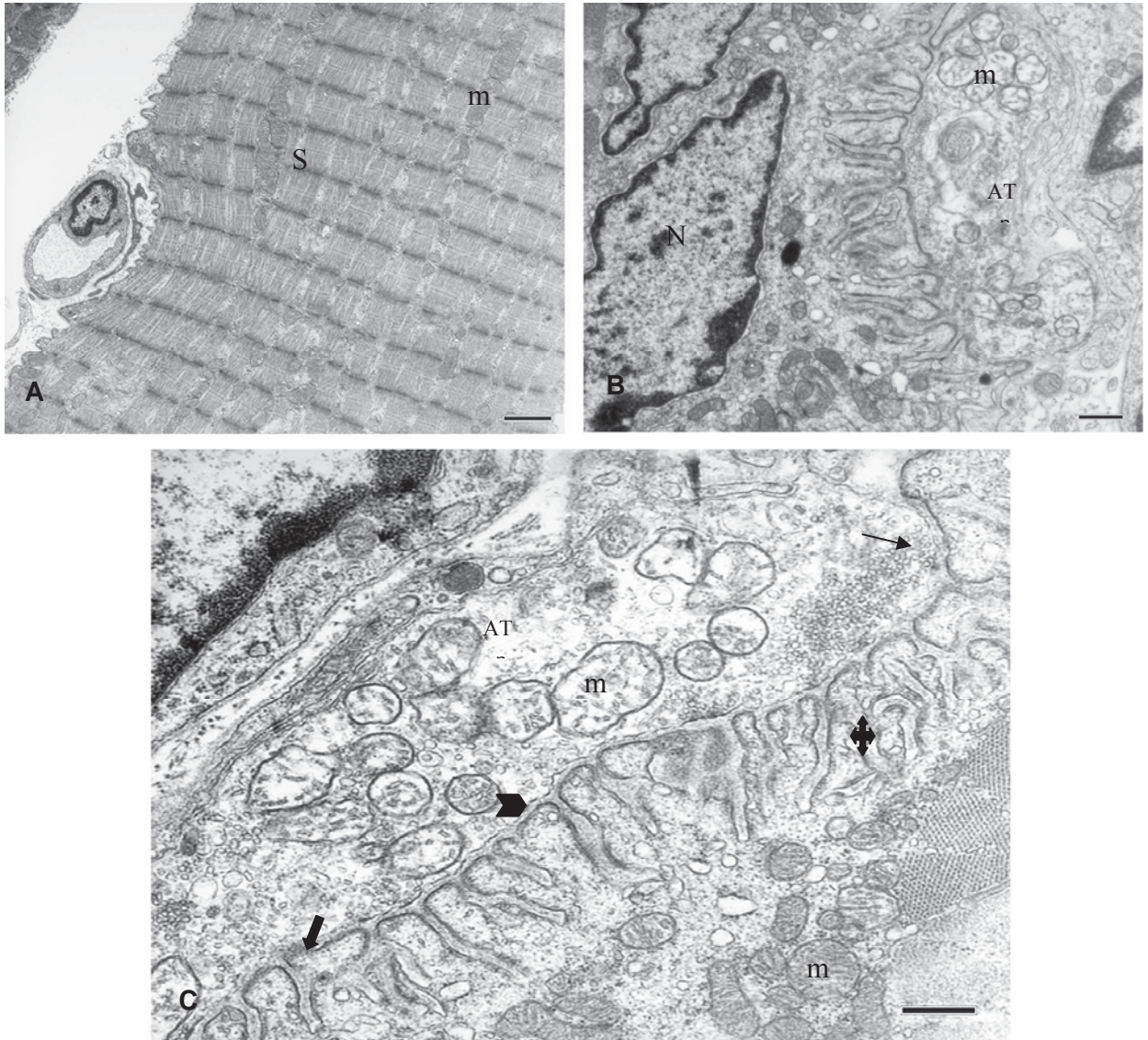
A região da fenda sináptica estava íntegra e, imediatamente abaixo dela a membrana pós-sináptica contendo muitas dobras juncionais. Em alguns pontos ficou evidente no ápice dessas dobras uma região mais eletrônica correspondente aos receptores de Ach (figura 8C). O sarcoplasma juncional associado à sinapse mostrou-se repleto de mitocôndrias e ribossomos, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi também estavam presentes.

FIGURA 7: Eletromiografias do músculo sóleo de ratos controle.



Em **A** axônio mielinizado associado à JNM. Em **B** fibra muscular com sarcômeros (S) e núcleo fundamental (N). Em **C, D, E** axônios terminais (AT), mitocôndrias (m), inúmeras vesículas sinápticas (→), dobras juncionais (◆), em **D** processos citoplasmáticos da célula de Schwann (→), e corpo multivesicular (↗). Escala da barra: **A**: 1,0 μm , **B**: 0,7 μm , **C e D**: 0,4 μm , **E e F**: 0,3 μm .

FIGURA 8: Eletromiografias do músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca.



Em **A** fibra muscular com sarcômeros (S) e núcleo fundamental (N). Em **B,C** axônios terminais (AT), mitocôndrias (m), inúmeras vesículas sinápticas (→),dobras juncionais (↕).Em **C** local de zona ativa (↓), região receptores de Acetilcolina(➤) Escala da barra: A:1,7 µm. B: 0,6 µm, C: 0,4 µm.

3.8. Discussão e Conclusão

Baseando-se nos resultados anatômicos obtidos no nosso estudo, verifica-se que embora não tenha havido diferença significativa entre o peso corporal dos animais CT comparados aos animais com IC, os sinais clínicos da IC foram comprovados através da observação de derrame pleural, ascite, trombo em átrio direito e hipertrofia do ventrículo direito (DALLA LIBERA et al., 1999, FELDMAN et al., 1993; DING et al., 2000). Além disso, houve aumento de peso das câmaras cardíacas (VE, VD, AT) bem como aumento na relação desses parâmetros/peso corporal. Esses dados também comprovam a presença da insuficiência cardíaca (CARVALHO et al., 2006).

A atrofia da musculatura esquelética na IC é acompanhada por alterações na matriz extracelular adjacente às fibras musculares e envolve, principalmente, apoptose de células intersticiais (VESCOVO et al., 1998; DALLA LIBERA et al., 1999; VESCOVO et al., 2000), aumento no conteúdo de colágeno (FILIPPATOS et al., 2005) e da atividade de metaloproteinases (MMPs) (SCHIOTZ THORUD et al., 2005).

A atrofia das fibras musculares na IC tem sido comumente observada tanto em estudos clínicos (SULIVAN et al., 1990; MANCINI et al., 1992; ANKER et al., 1999), como em trabalhos experimentais (DELP et al., 1997; CARVALHO et al., 2003; SCHULZE et al., 2003; DALLA LIBERA et al., 1999). No entanto, a atrofia é dependente do modelo utilizado bem como do tipo de músculo analisado. No nosso estudo, o músculo sóleo não apresentou atrofia muscular. No modelo de IC induzida por monocrotalina, droga que induz severa hipertensão arterial pulmonar seguida de hipertensão ventricular direita e insuficiência cardíaca aguda (REINDEL et al., 1990; VESCOVO et al., 1998), não foi observada atrofia no músculo sóleo (CARVALHO et al., 2006) e diafragma (LOPES et al., 2008), porém o músculo EDL apresentou atrofia (CARVALHO et al., 2006). Já, Martinez, 2008 observou atrofia no músculo

sóleo em ratos com IC induzida por infarto (ZORNOFF et al., 2000). Carvalho et al. 2003, evidenciaram atrofia nesse músculo em ratos com IC induzida por estenose aórtica (EAo). Alguns fatores parecem estar envolvidos na atrofia muscular, como condições de desuso (GUNDERSEN;MERLIE, 1994), envelhecimento (ALWAY et al. 2002b), redução da atividade física e neuromuscular, ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanham o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (DALLA LIBERA et al., 1999; FILLIPATOS et al., 2005; TOTH et al., 2006).

O grau e a duração da disfunção causada pela IC podem influenciar mudanças estruturais e bioquímicas no músculo esquelético (COIRAULT et al., 1999).Essas mudanças podem direta ou indiretamente influenciar a atividade da Junção Neuromuscular, incluindo a atividade das subunidades do receptor de acetilcolina.Mudanças na expressão gênica das subunidades do receptor podem estar relacionadas a mudanças nas propriedades do canal iônico e na membrana juncional(ADAMS, 1995).

Nossos resultados indicam uma tendência de aumento na subunidade epsilon. É bastante descrito que essa subunidade é encontrada apenas em músculos adultos em substituição à subunidade gama encontrada apenas na fase embrionária (MILLAR; HARKNESS, 2008). Essa tendência de aumento na expressão gênica da subunidade epsilon pode estar relacionada com o aumento da expressão da subunidade alpha, pois segundo Schwarz et al, 2000 a subunidade epsilon é essencial para a manutenção estrutural da junção neuromuscular, auxiliando na estruturação do pentâmero formado pelas subunidades (KALAMIDA et al., 2007).

Com relação à expressão gênica da subunidade gama, era de se esperar que ela não fosse expressa no músculo sóleo estudado, pois está presente apenas na fase embrionária ou em situações que remetem a fibra muscular a essa situação (SHAKMAN;BRENNER, 1978, MISHINA et al., 1986, SCHUETZE;ROLE, 1987). A subunidade gama é controlada por sinais neurais e

sinais dependentes da atividade elétrica do músculo. E fibras normais, a expressão do RNAm da subunidade gama é muito baixa sendo ligeiramente aumentada nos músculos que mantêm a inatividade elétrica pelo desuso da sinapses neuromusculares (WITZEMANN et al., 1991). Segundo Gattenlohner et al, 2002 esse tipo de receptor é apenas expresso em fibras do tipo I ou Slow fato que explica os nossos resultados obtidos no músculo sóleo, predominantemente lento. O estudo das subunidades de ACh revelaram aumento na expressão da subunidade alpha e uma tendência de aumento na subunidade epsilon. É bastante descrito que a subunidade epsilon é encontrada apenas em músculos adultos em substituição à subunidade gama, encontrada apenas na fase embrionária (MILLAR; HARKNESS, 2008). Essa tendência de aumento na expressão gênica da subunidade epsilon pode estar relacionada com o aumento da subunidade alpha, pois segundo Schwarz et al., (2000) a subunidade epsilon é essencial para manutenção estrutural da junção neuromuscular, ou seja, ela auxilia na estruturação do pentâmero formado pelas subunidades (KALAMIDA et al., 2007).

Além desses fatores que interferem nos níveis de expressão do RNAm das subunidades dos nAChR, estes são regulados pelos MRFs, pois mudanças no RNAm das subunidades são refletidas concomitantemente na expressão de receptores distintos. Como na IC há uma diminuição da expressão de MyoD, MRF4 e é conhecido que a MyoD e Myf-5 são regulados pela atividade muscular e permanecem elevados em músculos desnervados por um longo período de tempo talvez estes receptores estejam envolvidos na manutenção do estado de inervação (ADAMS, 1995; MA et al., 2007). Possivelmente o aumento da expressão gênica da subunidade alpha no grupo IC deve estar relacionada a uma tentativa da fibra muscular em manter sua atividade normal, tendo em vista que a subunidade alpha possui o sítio de ligação com o neurotransmissor, promovendo abertura do canal iônico que desencadeia a contração muscular.

Por outro lado como na IC existe uma modulação das fibras slow para fast (CARVALHO et al., 2003;SULLIVAN et al., 1990;MANCINI et al., 1992;DE SOUSA et al., 2000) e levando-se em consideração que estruturalmente as JNMs das fibras fast diferem das fibras slow (MATHEUS;SOARES, 2006), é provável que o aumento na expressão do receptor alpha de acetilcolina esteja relacionado à essas modulações adaptativas tanto metabólicas quanto fisiológicas do músculo. Estudos futuros deverão ser realizados a fim de verificar se essas modulações afetam a morfologia das JNM, bem como a distribuição dos receptores de Ach ao longo da membrana pós-sináptica.

As fibras musculares do sóleo mostraram resultados à aplicação da técnica de Esterase Inespecífica. As JNM foram marcadas nos grupos controle e tratado. O método de Esterase Inespecífica é baseado na hidrólise do acetato α -naftil pela enzima, o produto fenólico da reação e combinado com pararosanilina marca exatamente o local da reação, permitindo a observação da distribuição da JNM ao longo da fibra muscular do músculo sóleo (MATHEUS; SOARES, 1999). Os músculos estriados esqueléticos em geral possuem as junções neuromusculares distribuídas no seu terço médio. Outros músculos como os extra-oculares apresentam junções neuromusculares “simples” localizadas no terço médio e junções múltiplas localizadas nos terço proximal e distal dos músculos (MATHEUS; SOARES, 1999, 2006).

De acordo com nossos resultados não houve alterações na média do diâmetro das JNMs bem como na sua morfologia.

Alterações da junção são comuns com a idade (ANDONIAN; FAHIM, 1987; BARKER; IP, 1965; FAHIM, 1997; PRZYBYLA, 2005), traumas de nervos periféricos (GATTUSO et al., 1988) e grau de atividade (DESCHENES, 1993; FAHIM, 1997;FAHIM;ROBBINS,1986), imobilização (PACHTER;EBERSTEIN,1984, 1986) em casos de desnervação e dependentes da intensidade do estímulo nervoso (SOMASEKHAR et al., 1996

A diversidade funcional e metabólica dos diferentes tipos de fibras confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (CAMPOS et al., 2002). Contudo, as fibras musculares, bem como as junções associadas, exibem uma alta plasticidade, o que habilita este tecido a remodelar suas características morfológicas, metabólicas e funcionais, como resposta a estímulos específicos (PETTE; STARON, 2000; FLUCK; HOPPELER, 2003; MAGAUDDA et al., 2004). Acreditamos que a ação da insuficiência cardíaca não foi efetiva a ponto de promover alterações morfológicas nas JNMs.

Dentro da análise ultraestrutural a morfologia da JNM também se manteve normal em ambos os grupos estudados. As JNMs exibiram padrões normais morfológicos como o descrito por vários autores em relação aos seus componentes sinápticos, onde os botões terminais estão alojados em goteiras sinápticas, também chamadas fenda sináptica primária, correspondendo a uma depressão da fibra muscular (BOWDEN; DUCHEN, 1976; PETERS ET AL 1976). Os axônios terminais exibem um acúmulo de vesículas sinápticas com diâmetro variável (ENGEL; SANTA, 1971). Sendo que nos animais tratados observamos um acúmulo de vesículas sinápticas no axônio terminal. Nas JNMs do músculo sartório de coelhos submetidos a restrição de oxigênio houve diminuição no número e volume dessas vesículas (WANG ; LIU, 1990).

Essa variação pode ser explicada por alterações na complexidade da JNM (GOMEZ et al., 1996; MASELLI et al., 2003b) e pela sua considerável habilidade de responder a diferentes estímulos remodelando alguns dos seus componentes em detrimento de outros (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2009).

Muitas dessas vesículas estão agrupadas próximas de placas densas, chamadas zonas ativas, localizadas na superfície interna da membrana pré-sináptica que está relacionada à exocitose das mesmas. Também foram notados nos animais estudados a presença de corpos multivesiculares (MATTEOLI et

al., 1990) e mitocôndrias, responsáveis para suprir a energia necessária para síntese, estocagem e liberação de transmissores(HALL;SANES, 1993).

Recobrimo os botões sinápticos estavam presentes processos citoplasmáticos das células de Schwann terminais (KOIRALA ET AL 2003).

No compartimento pós-sináptico as dobras juncionais estavam íntegras e com grau diverso de complexidade que variam de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento, tipo de inervação, tipo de terminal nervoso e tipo de fibra muscular (ENGEL, 1994).

O sarcoplasma pós-juncional apresentou núcleos fundamentais e grande quantidade de mitocôndrias subsarcolemais. O núcleo muscular sináptico através da ativação transcricional de subunidades de genes , é responsável pelo acúmulo dos tipos de receptores de ACh na junção neuromuscular(RUFF,2003, HALL & SANES, 1993).

Acredita-se que embora segundo Carvalho et al., (2003) na IC exista uma modulação das fibras slow para fast, e levando-se em consideração que estruturalmente as JNM das fibras fast diferem das fibras slow (MATHEUS; SOARES,1999, 2006) , é bastante provável modulações ocorreram no músculo e nas suas JNMs embora não tenham sido tão severas a ponto de promover alterações detectáveis.

Provavelmente em nosso estudo, a insuficiência cardíaca não foi tão severa a ponto de promover alterações na morfologia da JNM embora, tenha havido remodelação dos receptores de acetilcolina. Diante disto estudos futuros deverão ser realizados a fim de verificar se ocorrem alterações na distribuição dos receptores de ACh ao longo da membrana pós-sináptica.

3.9. Referências

ADAMS GR, HATHER BM, BALDWIN KM, DUDLEY GA . Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. **J Appl Physiol**, v. 74, p.911-915, 1993.

ALBANESI FILHO, F.M. Insuficiência cardíaca no Brasil. **Arq Bras Cardiol**, v. 71, p. 561-62, 1998.

ALWAYS, S.E.; DEGENS, H.; LOWE, D.A.; KRISHNAMURTHY G. Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 282, p. R411–R422, 2002b

ANDONIAN, M.H.; FAHIM, M.A. Endurance exercise alters the morphology of fast- and slow-twitch rat neuromuscular junctions. **Int J Sports Med**, v. 9, p. 218-223, 1988.

ANDONIAN, M.H.; FAHIM, M.A. Effects of endurance exercise on the morphology of mouse neuromuscular junctions during ageing. **J. Neurocytolog**, v.16, p. 589-599, 1987.

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**, v. 9363, n. 361, p. 1077-83, 2003.

BARKER, D.; IP, M.C. Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and deafferented skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **Biol. Sci**, v. 163, p. 538-554, 1965.

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**, v. 11, n. 30, p. 2391-401, 1998.

BOWDEN,R.E.M.;DUCHEN,L.W. The anatomy and pathology of the neuromuscular junction.In: The neuromuscular junction.**Handbook of experimental Pharmacology**, Ed.E. Zaimis,Berlin,springer-Verlag,v. 42, p.23-97,1976.

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**, v. 4, n. 84, p. 201-6, 2003.

CARVALHO, R.F. et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. **Int J Exp Pathol**, v. 6, n. 87, p. 437-43, 2006.

_____.Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. **Int J Exp Pathol**, v. 87, p. 219-225, 2006.

CHANGEUX, J.P.; EDELSTEIN, S.J. Allosteric receptors after 30 years review. **Neuron**, v. 21, p. 959–980, 1998.

CHARBONNIER F, GASPERA B DELL, ARMAND ANNE-SOPHIE, LÉCOLLE S, LAUNAY T, GALLIEN CALUDE-LOUIS, CHANOINE C. Specific Activation of the Acetylcholine Receptor Subunit Genes by Myod Family proteins. *J Biol Chem*. 278(35): 33169-33174, 2003.

COHN, J.N. Current therapy of the failing heart. **Circulation**. v.78 (5 Pt 1):1099-107, 1988.

COIRAULT, C.; LANGERON, O. Lambert f. et al. Impaired skeletal muscle performance in the early stage of cardiac pressure overload in rabbits: beneficial effects of angiotensin converting enzyme inhibition. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 291, p.70–75, 1999.

COWIE, M.R. et al. The epidemiology of heart failure. **Eur Heart J**, v. 2, n. 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: Manole, 2005. p. 83-84

DALLA LIBERA, L. et al. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. **Am J Physiol**, v. 5, n. 277, p. 982-6, 1999.

DE SOUSA, E. et al. Heart failure effects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. **Circulation**, v. 15, n. 102, p. 1847-53, 2000.

DELP, M.D.; DUAN, C.; MATTSON, J.P.; MUSCH, T.I. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. **J Appl Physiology**, v. 83, p. 1291-1299, 1997.

DESAULNIERS, P.; LAVOIE, P.A.; GARDINER, P.F. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. **Neuroreport**, v. 9, p. 3549-3552, 1998.

DESCHENES, M.R. et al. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. **J. Neurocytology**, v. 22, p. 603-615, 1993.

_____. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 1576-1581, 2000.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v. 1, n. 37, p. 112-4, 116, 118-9, 2004.

DING, J.; WEXLER, A.S.; BINDER-MACLEOD, S.A. A predictive model of fatigue in human skeletal muscles. **J Appl Physiol**, v. 89, n. 4, p. 1322-32, 2000.

EDSTROM, E.; ALTUN, M.; HAGGLUND, M.; ULFHAKE, B. Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 7, n. 61, p. 663-74, 2006.

ENGEL, A. G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, G. Myology: basic and clinical. 2 Ed. New York: Edition International McGraw, 1129: 261-302, 1994.

ENGEL, A.G.; SANTA, T. Histometric analysis of ultrastructural of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. **Ann. NY Acad. Sci.**, 183, p. 46, 1971.

FAHIM, M.A. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/NNia aging mice. **J Appl Physiol**, v. 83, p. 59-66, 1997.

FAHIM, M.A.; ROBBINS, N. Remodeling of the neuromuscular junction after subtotal disuse. **Brain Res**. v. 383, p. 353-356, 1986.

FELDMAN, A.M. et al. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. **Circ Res**, v. 73, n. 1, p. 184-92, 1993.

FILIPPATOS, G.S.; ANKER, S.D. Kremastinos. Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 8, n. 3, p. 249-254, 2005.

GATTENLÖHNER, S.; SCHNEIDER, C.; THAMER, C.; KLEIN, R.; ROGGENDORF, W.; GOHLKE, F.; NIETHAMMER, C.; CZUB, S.; VINCENT, A.; MÜLLER-HERMELINK, H.K.; MARX, A. Expression of fetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibres in human neuromuscular disorders. **Brain**, v. 125(Pt 6), p.1309-19, 2002.

GATTUSO, J.M.; DAVIS, A.H.; GLASBY, M.A. et al. Peripheral nerve repair using muscle autografts. Recovery of neuromuscular transmission after peripheral nerve repair with muscle autografts in the non-human primate. **J Bone Joint Surg**, v. 70, p. 524-529, 1988.

GILMOUR, B.P. et al. Multiple bindings sites for myogenic regulatory factors are required for expression of the AchR gamma-subunit gene. **J. Biol Chem**, v. 266, p. 19871-19874, 1991.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression **Methods**, v. 4, n. 25, p. 386-401, 2001.

GIVERTZ, M.M.; COLUCCI, W.S.; BRAUNWALD, E. (2005) Clinical Aspects Of Heart Failure; Pulmonary Edema, High-Output Failure. In: Zipe DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E (Eds). Braunwald's heart disease: a text book of cardiovascular medicine (7th ed.) Elsevier Saunders, Philadelphia: 539-568, 2005.

GOMEZ, C. M. et al. A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome. **Ann. Neurol**, v. 39, p. 712-723, 1996.

GUNDERSEN, K.; MERLIE, J.P. Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 91, p. 3647-3651, 1994.

HALL. Z. W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. **Cell**, n. 72, p. 99-121, 1993.

HARRINGTON, D. et al. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol**. v.30, n. 7, p. 1758-64, 1997.

KALAMIDA, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. **Febs J**, v. 274, n. 15, p. 3799-845, 2007.

KOIRALA, S.; REDDY, L.V.; KO, C.P. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. **J. Neurocytol**, n. 32, p. 987-1002, 2003.

LEHRER, G.M.; ONSTEIN, L.A. A diazo coupling method for electron microscopic localization of cholinesterase. **Byophysic Biochem.Cytol**, v. 6, p. 399-419, 1959.

LIPKIN, D.P. et al. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **Int J Cardiol**, v. 2, n. 18, p. 187-95, 1998.

LIU, S. et al. Interaction of MyoD family proteins with enhancers of AchR subunit genes in vivo. **J. Biol Chem.** v. 275, p. 41364-41368, 2000.

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. **Methods**, v. 4, n. 25, p. 402-8, 2001.

LOPES, F.S. et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. **Int. J. Exp. Path**, v. 89, p. 216-222, 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 . **J. Orthop. Res**, v. 25, n. 11, p. 1498-1505, 2007.

MADY, C. Current Situation of the Treatment of Heart Failure in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 4, n. 89, p. 84-86, 2007.

MAHADEVA, B.; PHILIPS, L.H.; JUEL, V.C. Autoimmune disorders of neuromuscular transmission. **Semin Neurol**, v.28, n. 2, p. 212-27, 2008.

MANCINI, D.M.; et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation**, v.85, n.4, p. 1364-73, 1992.

MARTINEZ, P. F. Expressão dos fatores de regulação miogênica, composição das miosinas e trofismo no músculo esquelético periférico de ratos com insuficiência cardíaca crônica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, FM de Botucatu, UNESP. 71p, 2008.

MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2009 Silencing rapsyn in vivo decreases acetylcholine receptors and augments sodium channels and secondary postsynaptic membrane folding. **Neurobiology of Disease**, v.35, p.14-23, 2009.

MASELLI, R.A. et al. Presynaptic failure of neuromuscular transmission and synaptic remodeling in EA2. **Neurobiology**, v.61, p. 1743-1748, 2003b.

MATHEUS, S.M.M.; SOARES, J.C. Ultrastructural aspects of the retractor ocular bulbi muscle in the opossum (*Didelphis albiventris*). **J. of Sub Cytol and Pathol**, v. 31, n. 1, p. 163-168, 1999.

MATHEUS, S.M.M.; SOARES, J.C. Ultrastructural study of muscle fibers and neuromuscular junctions of the opossum thyroarytenoid muscle. **Braz. J. of Morphol. Sci**, v. 23, p. 229-235, 2006.

MATTEOLI, M. et al. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. **J. Mol. Neurosci**, v. 2, p. 175-184, 1990.

MATTHEWS_BELLINGER, J.;SALPETER, M.M. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. **J. Physiol**, v. 279, p. 197-213, 1978.

MCGEACHI A.B., KOISHI K, ANDREWS Z.B., MCLENNAN IS. Analysis of mRNAs that are enriched in the post-synaptic domain of the neuromuscular junction. **Mol Cell Neurosci**, v.2, n.30, p. 173-85, 2005.

MEDHURST, A.D.; HARRISON, D.C.; READ, S.J.; CAMPBELL, C.A.; ROBBINS ,M.J.; PANGALOS, M.N .The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. **J Neurosci Methods**, v. 98, p. 9-20, 2000.

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the Myod family of transcription factors. **Biochem Cell Biol**, v. 73, n. 9-10, p. 723-732, 1995.

MILLAR, N.S.; HARKNESS, P.C.Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. **Molecular Membrane Biology**, v. 4 , n 25, p. 279-292, 2008.

MISHINA, M.; TAKAI, T.; IMOTO, K. et al. Molecular distinction between fetal and adults forms of muscle acetylcholine receptor. **Nature**, v. 321, p. 406, 1986.

NOLAN T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v.3, n.1, p. 1559-82, 2006.

NUMBERGER, M.; DÜRR, I.; KUES, W.; KOENEN, M.; WITZEMANN. Different mechanisms regulate muscle – specific AchR gamma- and epsilon-subunit gene expression. **Embo J**, v. 10, p. 2957-2964, 1991.

PACHTER, B. R.; EBERSTEIN, A. Neuromuscular plasticity following limb immobilization. **J. Neurocytol**, v. 13, p. 1013-1025, 1984.

PACHTER, B. R.; EBERSTEIN, A. The effect of limb immobilization and stretch on the fine structure of the neuromuscular junction in rat muscle. **Exp. Neurol**, v. 92, p. 13-19, 1986.

PIETTE, J.; BESSEREAU, J.L.; HUCHET, M.; CHANGEUX, J.P. Two adjacent MyoD1 – binding sites regulate expression of the AchR alpha – subunit gene. **Nature**, v. 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**, v. 129 (1S Suppl), p. 260S-263S, 1999.

POOLE-WILSON, P.A.; FERRARI, R. Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 28, n.11, p. 2275-2285, 1996.

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. **J. Biol Chem**, v. 266, n.33, p. 22588-22596, 1991.

PRZYBYLA, B. et al. Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. **Exp. Gerontol**, v. 41, n. 3, p. 320-327, 2005.

RADONIĆ, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochem Biophys Res Commun**, v.4, n. 313, p. 56-62, 2004.

REINDEL, J. F. et al. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 2, n. 106, p. 179-200, 1990.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Human Press; Totowa, NJ; 365-386.

RUFF, R. L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 998, p. 1-10, 2003.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 389-442, 1999.

SCHIOTZ THORUD, H. M. Enhanced matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles of rats with congestive heart failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, n.2, p. R389-R394, 2005.

SCHUETZE, S.M.; ROLE, L.W. Development regulation of nicotine acetylcholine receptors. **Annu Rev Neurosci**, v. 10, p. 403-457, 1987.

SCHULZE, P.C. et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. **Basic Res Cardiol**, v. 98, n. 4, p. 267-74, 2003.

SHAKMAN, B.; BRENNER, H.R. Change in Synaptic Channel gating during neuromuscular development. **Nature**, v.276, p. 401,1978.

SCHUETZE, S.M.; ROLE, L.W. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors. **Annu Rev Neurosci**, v.10, p. 403, 1987.

SIMON, A.M.; BURDEN, S.J. An Ebox mediates activation and repression of the acetylcholine receptor delta – subunit gene during myogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 5133-5140, 1993.

SIMONINI, A. et al. Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 28, n.8, p. 1683-1691, 1996.

SOMASEKHAR, T.; NORDLANDER, R.H.; REISER, P.J. Alterations in neuromuscular junction morphology during fast-to-slow transformation of rabbit skeletal muscles. **J Neurocytol**, v. 25, n.5, p.315-31,1996.

SULLIVAN, M.J.; GREEN, H.J.; COBB, F.R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, v. 81, n. 2, p. 518-527, 1990.

TOTH, M.J.; GOTTLIEB, S.S.; FISHER, M.L.; POEHLMAN, E.T. Skeletal muscle atrophy and peak oxygen consumption in heart failure. **Am J Cardiol**, v. 79, n. 9, p. 1267-9, 1997.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, 2002.

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**, v. 1, n. 39, p. 233-41, 1998.

WAERHAUG, O.; DAHL, H. A; KARDEL, K. Different effects of physical training on morphology of motor nerve terminals in rat extensor digitorum longus and soleus muscle. **Anat Embryol**, v. 186, p. 125-128, 1992.

WALTON, W.J.N. The anatomy and physiology of the motor unit In: Disorders of voluntary muscle. 5.ed Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988.

WANG, Z.Z. et al. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in MyoD - null mice. **J.Neurosc**, v. 12, n. 23, p. 5161–5169, 2003.

WANG, Y.T.; LIU, Z. M. Morphometric study of neuromuscular junction in rabbits subjected to shock by superior mesenteric artery occlusion. **Crit. Care Med**, v.18, n.2, p. 213-7, 1990.

WILSON, J.R. Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. **J Mol Cell Cardio**, v. 28, n.11, p. 2287-2292, 1996.

WITZEMANN, V.; BRENNER, H.R.; SAKMANN, B. Neural factors regulate AchR subunit mRNAs at Rat Neuromuscular Synapses . **J. Cell Biol**, v.1, n.114, p.125-41, 1991.

WONG, M. L.; MEDRANO, J.F. Real-Time for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, p. 1-11, 2005.

ZAR, J. H., 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Preutice-Holl, New Jersey, 663p.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. **Basic Res Cardiol**, v. 95, p. 208-214, 2000.