

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO DOS FATORES DE REGULAÇÃO  
MIOGÊNICA EM CULTURA DE MIOBLASTOS  
SUBMETIDOS AO TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$**

**RAFAEL DARIOLLI**

Orientadora: Profa Dra Maeli Dal Pai Silva

**Monografia apresentada ao Departamento de  
Morfologia do Instituto de Biociências da  
UNESP - Campus de Botucatu, como  
exigência parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas**

**B O T U C A T U - S P  
2008**

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*

Dariolli, Rafael.

Expressão dos fatores de regulação miogênica em cultura de mioblastos submetidos ao TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  / Rafael Dariolli. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Maeli Dal Pai Silva

1. Biologia celular 2. Biologia molecular

Palavras-chave: C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>; IFN-  $\gamma$ ; Miogênese; RT-PCR; TNF- $\alpha$ ;

*Dedico este trabalho a meus pais que  
sempre com muito amor, carinho,  
compreensão e dedicação me apoiaram  
em todas as decisões que tomei e  
situações que vivi durante meus anos de  
faculdade. Obrigado meus amores.*

*O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.*

*Texto Budista*

## *Agradecimento*

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e a motivação de olhar sempre à frente permitindo que eu trabalhe para conquistar cada vez mais meus maiores anseios.

A meus pais, pessoas iluminadas que sempre com muita simplicidade e respeito ao próximo trabalharam para conquistar boa condição de vida e assim sustentar a linda família que construíram. Ainda quero agradecer profundamente a força de vontade para com minha vida em um dos momentos mais difíceis de nossas vidas, onde o amor superou qualquer possibilidade de desistência. Se eu estou aqui hoje é por causa de vocês DUAS VEZES. Obrigado.

A minha irmã, uma garota maravilhosa que veio ao mundo para dar muitas alegrias a nossa família. Muito obrigado por ouvir os choros e reclamações do turrão do seu irmão mais velho.

A minha orientadora, amiga, mãe por consideração. Uma mulher maravilhosa que além de me ensinar muito sobre como ser um pesquisador ainda me ensinou e ainda ensina muito sobre a vida e a realidade da mesma. Maeli você é uma mulher abençoada, uma pessoa como poucas que conheci até hoje, além de uma ótima profissional, uma mãezona mesmo que soube ouvir e aconselhar seu aluno e amigo nos momentos que este mais precisou. Muito obrigado por tudo que tem sido para mim.

A meus bons amigos que sempre mais ou menos estiveram a meu lado dando apoio, carinho, amizade, compreensão, risadas, conhecimento e muito mais. Robson (Jubarte), Braz (Zuza), Gisele (Rubinha), Helvia (Xumbrek), Fábio (Mininão), Ricardo (Siluete), Rafael (Kenga), Matheus (Maths) entre tantos outros que conheci neste cinco anos e meio de Unesp Botucatu, meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	I
Lista de Tabelas .....	II
Resumo .....	1
1.Introdução .....	2
2.Objetivo .....	5
2.1.Gerais .....	5
2.2.Específicos .....	5
3.Material e Métodos .....	6
3.1.Cultura Celular .....	6
3.2.Esquema de tratamento das culturas celulares.....	6
3.3.Extração do ácido ribonucléico (RNA) .....	7
3.4.Gel analítico de agarose para verificação da integridade do RNA.....	8
3.5.Tratamento do RNA com Dnase.....	8
3.6.Transcrição Reversa do RNA (RT) .....	9
3.7.Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	9
3.8.Análise estatística dos dados .....	12
4.Resultados e Análise Estatística dos Dados .....	13
4.1.Cultura Celular.....	13
4.2.Espectrofotometria.....	14
4.3.Gel analítico de agarose para RNA .....	15
4.4.RT-PCR - análise dos níveis de expressão dos MRFs.....	16
5.Discussão .....	20
6.Considerações Finais .....	24
7.Bibliografia.....	25

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cultura de mioblastos C2C12. ....	13
<b>Figura 2:</b> Gel analítico para análise da qualidade do RNA extraído das culturas de C2C12. ....	15
<b>Figura 3:</b> Expressão do gene MyoD, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe .....	16
<b>Figura 4:</b> Expressão do gene MyoD, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. ....	17
<b>Figura 5:</b> Expressão do gene Miogenina, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe .....	17
<b>Figura 6:</b> Expressão do gene Miogenina, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. ....	18
<b>Figura 7:</b> Expressão do gene Myf5, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe .....	18
<b>Figura 8:</b> Expressão do gene Myf5, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12 .....	19
<b>Figura 9:</b> Expressão do gene GAPDH, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe .....	19

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela I:** Seqüência de primers utilizados para a reação de RT-PCR..... 11

**Tabela II:** Análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídos de culturas C2C12 de mioblastos diferenciados em miotubos ..... 14

## **Resumo**

**Introdução:** A insuficiência cardíaca (IC) está associada a miopatia dos músculos esqueléticos dos membros, com perda da massa muscular, diminuição na proporção das fibras do tipo I (contração lenta) e aumento na proporção das fibras do tipo II (contração rápida). É provável que alterações na expressão de fatores de transcrição pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF-4, conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs), sejam responsáveis pelas mudanças nos tipos de fibras. Enquanto que a Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, o oposto é verdadeiro para músculos rápidos. Similarmente, a MyoD está associada com a expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada rápidas dos tipos IIX e IIB. Estudos *in vitro*, demonstraram que o TNF- $\alpha$  inibe a expressão de MyoD e miogenina diminuindo a atividade de genes músculo específicos. A ação do TNF- $\alpha$  diminuindo a expressão da MyoD mostra-se mais acentuada quando em associação com o IFN- $\gamma$ , no entanto, há poucas informações na literatura a respeito do papel desta associação na expressão dos fatores de regulação miogênica, *in vitro*.

**Objetivo:** Avaliar a expressão dos fatores de regulação miogênica, MyoD, miogenina, Myf5, e MRF-4 em cultura de mioblastos C2C12 submetidos ao TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ .

**Resultados:** Nossos resultados mostraram um aumento na expressão dos genes MyoD, Myf5 e miogenina sob tratamento com IFN- $\gamma$  quando comparado aos grupos controle e TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . A expressão gênica do MRF-4 na cultura de células não foi detectada em nenhum dos grupos analisados. O GAPDH foi utilizado para normalizar os valores de expressão dos outros genes analisados.

**Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o IFN- $\gamma$  exógeno administrado às culturas de mioblastos de C2C12 diferenciados em miotubos tem influência sobre a proliferação e diferenciação destas culturas, já que MyoD, Myf5 e miogenina apresentaram expressão de mRNA aumentada.

## **1. Introdução**

A insuficiência cardíaca (IC) constitui um importante problema clínico devido à gravidade de suas manifestações e a sua prevalência. 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 em 2005, as doenças do aparelho circulatório, em especial a IC, são a segunda maior causa de internações somando 10,34% do total em todo o país (Ministério da Saúde/SE/Datasus – Sistema de Informações Hospitalares do SUS, 2008).

Entre os principais sintomas da IC encontram-se: dispnéia, intolerância para realizar exercícios físicos e redução da atividade locomotora, associada com fadiga de membros inferiores (Poole-Wilson & Ferrari, 1996; Wilson, 1996; Bigard *et al.*, 1998). Embora vários fatores tenham sido descritos como responsáveis pelo desenvolvimento de fadiga nos pacientes com IC, sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida. Esse fenômeno é decorrente, em parte, da presença de atrofia da musculatura esquelética, observada em 68% dos pacientes com essa síndrome (Mancini *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1997; Poehman, 1999). Outro fator responsabilizado pelo desenvolvimento da fadiga é a presença de alterações na frequência dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos; há diminuição na proporção das fibras do tipo I, de contração lenta, e aumento na proporção das fibras do tipo II, de contração rápida (Lipkin *et al.* 1988; Sullivan *et al.* 1990; Mancini *et al.* 1992; De Sousa *et al.* 2000). A IC induz expressão de isoforma de cadeia pesada de miosina (MHC) em direção a isoforma rápida (Vescovo *et al.* 1998a; Simonini *et al.* 1996), a qual está relacionada com a severidade da IC (Spangenburg *et al.* 2002). Dados do nosso laboratório também demonstraram mudanças na composição das isoformas da miosina e na proporção dos

tipos de fibras durante a transição de hipertrofia ventricular para IC (Carvalho *et al.*, 2003).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na composição das isoformas da miosina no músculo esquelético, em presença de IC, não estão completamente definidos. É provável que fatores de transcrição pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF-4, conhecidos como fatores de regulação miogênica, sejam responsáveis pelas mudanças nos tipos de fibras. Na miogênese, esses fatores transcricionais músculo-específicos regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas. A MyoD e a Myf5 são expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, enquanto que a Miogenina e o MRF-4 são expressos em células no final da fase de diferenciação (Megenev & Rudnicki, 1995). Esses fatores ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, levando à expressão dos mesmos (Murre *et al.*, 1989).

Na fibra muscular adulta, a Miogenina e a MyoD também podem estar envolvidas na manutenção do seu fenótipo, rápido ou lento; a Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (Hughes *et al.*, 1993; Voytik *et al.*, 1993). Similarmente, a MyoD é associada com a expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada rápidas dos tipos IIX e IIB (Hughes *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1997, Mozdziak *et al.*, 1998; Mozdziak *et al.*, 1999, Seward *et al.*, 2001). Como na IC existe uma transição das isoformas de miosina de lenta para rápida, é provável que essa alteração seja decorrente de uma mudança na expressão dos fatores de regulação miogênica, MyoD e miogenina.

Na IC, sabe-se que os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) , bem como seus receptores solúveis encontram-se elevados (Levin *et al.*, 1990; McMurrue *et al.*, 1991; Dukta *et al.*, 1993, Anker *et al.*, 1999). Estudos *in vitro*, demonstraram que o TNF- $\alpha$  inibe a expressão de MyoD e miogenina diminuindo a atividade de genes de miosina de cadeia pesada durante a miogênese (Szalay *et al.* 1997). A ação do TNF- $\alpha$  diminuindo a expressão da MyoD mostra-se mais acentuada quando em associação com o IFN- $\gamma$  (interferon-gama) (Acharyya *et al.*, 2004), no entanto, há poucas informações na literatura a respeito do papel do TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  na expressão dos fatores regulação miogênica, miogenina e MRF-4.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Gerais**

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a expressão dos fatores de regulação miogênica, MyoD, Myf5, miogenina, e MRF-4, em cultura de mioblastos submetidos a tratamentos contendo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

### **2.2. Específicos**

1. Padronizar culturas de mioblastos. Cultivo, expansão e manutenção;
2. Padronizar a forma de tratamento de TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  a ser utilizada nas culturas de mioblasto;
3. Padronizar condições de uso para os primers escolhidos para a realização de RT-PCR;
4. Analisar efeitos dos tratamentos realizados sobre as culturas de mioblastos utilizando o RT-PCR;
5. Analisar estatisticamente os dados encontrados.

### ***3. Materiais e Métodos***

#### ***3.1. Cultura Celular***

As células C2C12, uma linhagem comercial de mioblastos, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, sendo que as mesmas foram enviadas em fase de proliferação em garrafas de 25cm<sup>3</sup>, imersas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM).

Inicialmente, o meio de cultura foi retirado e as células foram tripsinizadas para que pudéssemos expandir as culturas. Foi utilizada a tripsina (0.25% tripsina em 1mM EDTA), para soltar as células da superfície da garrafa. Assim, ao final da primeira tripsinização, passamos a ter dois grupos de células: um grupo de expansão e um grupo utilizado para o experimento. Cada grupo foi constituído por metade das células tripsinizadas. No grupo de expansão, as células foram cultivadas em garrafas com DMEM + 20% soro fetal bovino (FBS) até atingirem uma confluência de 80% e então foram expandidas novamente. A outra metade das células foi transferida para placas de 6 poços formando o grupo de estudo (Figura 1). Esse procedimento foi adotado até conseguirmos todos os grupos de estudo em quantidades adequadas (controle e submetidos ao tratamento com TNF- $\alpha$  (5 ng/mL), IFN- $\gamma$  (50 U/mL) e TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (5 ng/mL + 50 U/mL).

#### ***3.2. Esquema de tratamento das culturas celulares***

Decorridos seis a sete dias do plaqueamento, quando os mioblastos já estavam diferenciados em miotubos, iniciou-se o tratamento das culturas. Os miotubos foram tratados com TNF- $\alpha$  (5 ng/mL), IFN- $\gamma$  (50 U/mL) e TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (5 ng/mL + 50 U/mL) por 48 horas (Acharyya et al., 2004). O TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  foram diluídos para a

concentração desejada no meio de cultivo das células e as culturas controles não foram tratados com as interleucinas. Após as 48 horas de tratamento, as células foram dissociadas com TRIzol e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA.

### ***3.3.Extração do ácido ribonucléico (RNA)***

Em cada grupo de estudo, as células foram lisadas com TRIzol<sup>®</sup> (1 mL de TRIzol/3.5 cm do diâmetro das placa). O TRIzol<sup>®</sup>, solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5mL e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foi acrescentados 0,2mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado novamente, desta vez, 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.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente), durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de RNA formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 x g por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a remoção do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet de RNA foi seco em temperatura ambiente

durante cinco minutos. O RNA total foi dissolvido em água destilada e livre de DNase e Rnase (Gibco<sup>®</sup>), incubado por 10 minutos a 60°C (para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, finalmente, armazenado à -80°C. O RNA 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, este dado nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração (Tabela II).

### ***3.4. Gel analítico de agarose para verificação da integridade do RNA***

A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada na corrente constante de 70mA por aproximadamente 45 minutos. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com SYBR safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e sobre o Foto UV 450 DNA Transilluminator, da Fotodyne Incorporated, o RNA foi visualizado e fotografado, com filme de revelação instantânea 677 da Polaroid (Figura 2).

As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

### ***3.5. Tratamento do RNA com Dnase***

Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen<sup>®</sup>), o RNA total, destinado à reação de transcrição reversa, foi transferido para um microtubo estéril contendo 1mL de tampão DNase I (1 unidade/mL) e água destilada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µL de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos.

### ***3.6. Transcrição Reversa do RNA (RT)***

A transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). A transcrição reversa do RNA total obtido das células foi realizada incubando-se, por 5 minutos a 75 °C, alíquotas contendo 1 µg de RNA total ao qual foi adicionado 1 µl de Ramdon Primers e 13 µl de H<sub>2</sub>O com DEPC por amostra. Em seguida, foi adicionado 11 µl de uma mistura composta de 4 µl de água DEPC, 5 µl de tampão de transcriptase reversa (MMLV reverse transcriptase 5X buffer), 1,3 µl de dNTPs 10 mM, 0.625 µl de RNA Inhibitor (inibidor de RNAses), 1 µl de enzima de transcriptase reversa. A mistura foi incubada a 42 °C durante uma hora, posteriormente seguido por um período de 15 minutos a 75 °C.

### ***3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)***

PCR é uma técnica utilizada para se obter grandes quantidades de uma determinada seqüência-alvo do DNA. A seqüência-alvo a ser amplificada é identificada por primers que reconhecem parte desta seqüência no cDNA por complementaridade de bases. O DNA é formado por duas cadeias complementares associadas, formando uma dupla fita; portanto, são necessários 2 primers (sense e antisense) com capacidade de reconhecer a seqüência-alvo em cada uma das fitas. A hibridização dos primers na seqüência-alvo marca o local do início da síntese: o sense demarca a síntese no sentido 3'-5' da cadeia de cDNA e o antisense no sentido inverso. Na reação de PCR, a seqüência-alvo é amplificada em cópias pela ação da enzima Taq DNA Polymerase<sup>®</sup> (Invitrogen).

Para a realização da reação de PCR, alíquotas de 1 µl de cDNA foram amplificadas utilizando 0.2 mM de cada primer (Tabela 1), tampão de PCR sem Mg 1X,

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs (0.2 mM ) e 1 unidade de *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de 25 µl.

Os primers utilizados foram (Tabela I): MyoD, Myf5, miogenina, MRF4 e GAPDH. Todos os primers foram sintetizados comercialmente e ressuspensos em água autoclavada para uma concentração de 10 µM.

Os ciclos utilizados para cada jogo de primers foram padronizados para determinação do número de ciclos de PCR dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica com o incremento do número de ciclos. Ao final dos ciclos, 5 µl do produto da reação de PCR será analisado em gel de agarose 1% em tampão TBE (1x) e corado com SYBR safe (Invitrogen®).

As bandas referentes à amplificação dos fatores transcricionais e do controle interno foram visualizadas em transiluminados, fotografadas e analisadas densitometricamente. Os valores dos produtos do PCR foram normalizados pelos valores dos produtos do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

**Tabela I:** Sequência de primers utilizados para a reação de RT-PCR.

Produto	N° de Acesso	Sequência	Posição Inicial	T <sub>A</sub> , °C	Ciclos	Fragmento PCR, pb
Miogenina	NM_031189	5' - ACCAGGAGCCCCACTTCTAT	32	60	28	338
		3' - GCGCAGGATCTCCACTTTAG	369			
MRF4	NM_008657	5' - AGATCGTCGGAAAGCAGCTA	276	G	35	344
		3' - TTGCTCCTCCTTCCTTAGCA	619			
Myf5	NM_008656	5' - AGACGCCCTGAAGAAGGTCAA	280	60	33	417
		3' - TGGAGAGAGGGAAGCTGTGT	696			
MyoD	NM_010866	5' - TACCCAAAGGTGGAGATCCTTG	431	60	32	455
		3' - CTGGGTTCCCTGTCTGTGT	885			
GAPDH	M32599	5' - ACTCCACTCACGGCAAATTC	143	60	28	379
		3' - GTCATGAGCCCTTCCACAAT	521			

N° Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank; pb: pares de bases, T<sub>A</sub>, °C: Temperatura de anelamento dos primers em °C. G: gradiente de temperatura.

### ***3.8. Análise estatística dos dados***

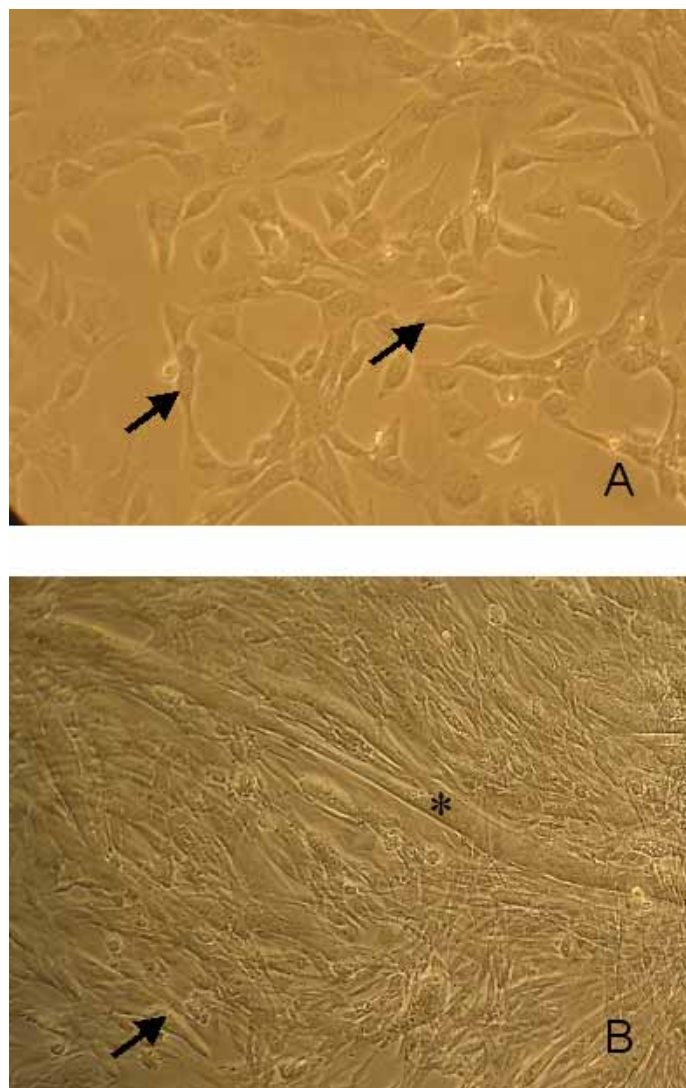
Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  DP. Para a análise estatística dos dados utilizamos a Análise de Variância, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Uma diferença de 5% foi considerada estatisticamente significativa.

## 4. Resultados e Análise Estatística

### 4.1. Cultura Celular

Os procedimentos descritos em Materiais e Métodos para a proliferação e diferenciação dos mioblastos C2C12 foi adotado até conseguirmos todos os grupos estudados (controle e submetidos ao tratamento com TNF- $\alpha$  (5 ng/mL), IFN- $\gamma$  (50 U/mL) e TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (5 ng/mL + 50 U/mL)).

Na figura 1 podemos observar dois estágios de desenvolvimentos das culturas de C2C12.



**Figura 1:** Cultura de mioblastos C2C12. **A:** mioblastos (seta) com 2 dias de cultura. **B:** mioblastos (seta) com 6 dias de cultura; miotubos(\*).

## 4.2. Espectrofotometria

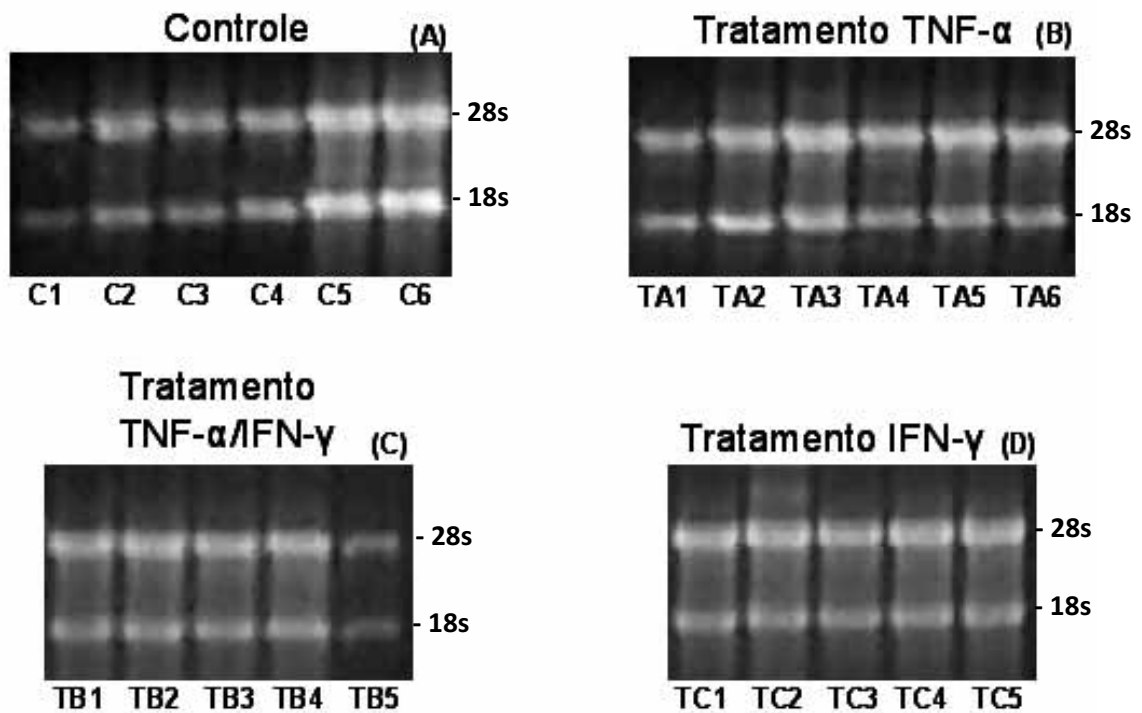
As amostras de RNA extraídas das culturas de C2C12 foram quantificadas por espectrofotometria. Foram realizadas leituras de absorvância à 260nm e 280nm e a partir destas leituras, a razão 260nm/280nm foi calculada para estimar a qualidade do RNA extraído. Valores de razão superiores a 1,65 são considerados bons. Os dados obtidos estão representados na Tabela II.

<i>Amostra</i>	<i>260nm</i>	<i>280nm</i>	<i>Razão (r)</i>
<b>C1</b>	0,162	0,077	2,10
<b>C2</b>	0,446	0,219	2,04
<b>C3</b>	0,402	0,197	2,04
<b>C4</b>	0,413	0,212	1,94
<b>C5</b>	1,265	0,635	1,99
<b>C6</b>	1,117	0,545	2,05
<b>TA1</b>	0,506	0,258	1,96
<b>TA2</b>	0,811	0,402	2,02
<b>TA3</b>	1,183	0,588	2,01
<b>TA4</b>	0,701	0,344	2,04
<b>TA5</b>	0,944	0,465	2,03
<b>TA6</b>	0,738	0,365	2,02
<b>TB1</b>	1,292	0,637	2,03
<b>TB2</b>	1,177	0,585	2,01
<b>TB3</b>	1,104	0,562	1,96
<b>TB4</b>	1,193	0,633	1,88
<b>TB5</b>	0,182	0,090	2,02
<b>TC1</b>	1,196	0,593	2,02
<b>TC2</b>	1,059	0,526	2,01
<b>TC3</b>	0,811	0,446	1,82
<b>TC4</b>	1,063	0,523	2,03
<b>TC5</b>	1,322	0,682	1,94

**Tabela II:** Análise espectrofotométrica das amostras de RNA extraídos de culturas C2C12 de mioblastos diferenciados em miotubos. **C\***: amostras representantes do grupo controle; **TA\***: amostras representantes do grupo tratado com TNF- $\alpha$ ; **TB\***: amostras representantes do grupo tratado com TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$ ; **TC\***: amostras representantes do grupo tratado com IFN- $\gamma$ .

### 4.3. Gel analítico de agarose para RNA

As amostras de RNA extraídas das culturas de C2C12 foram submetidas a análise de qualidade por gel de agarose 1%. Os resultados obtidos estão representados na Figura 2.



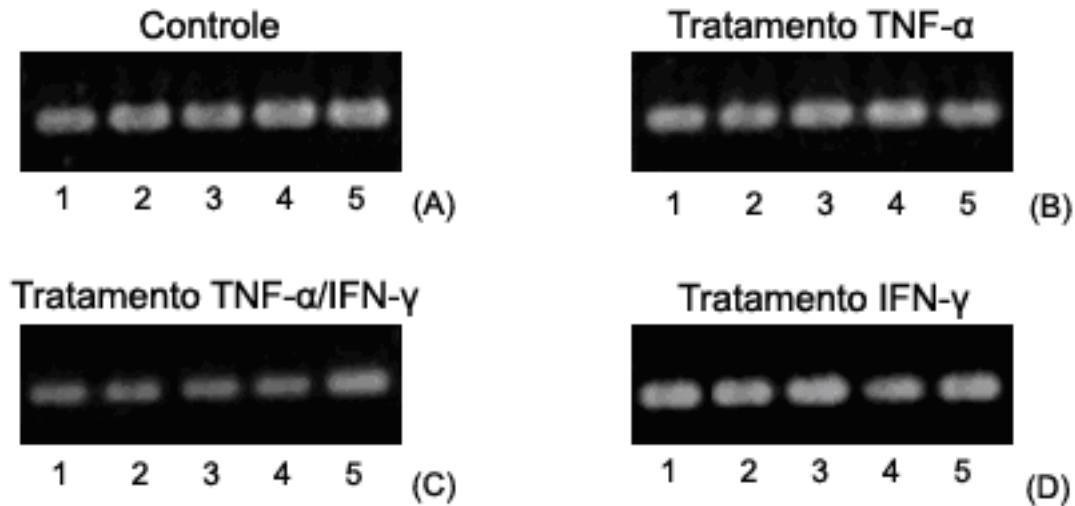
**Figura 2:** Gel analítico para análise da qualidade do RNA extraído das culturas de C2C12. (A): Controle; (B): células tratadas com TNF- $\alpha$ ; (C): células tratadas com TNF-  $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ; (D): células tratadas com IFN- $\gamma$ . C\*: amostras controle; TA\*: amostras tratadas com TNF-  $\alpha$ ; TB\*: amostras tratadas com TNF-  $\alpha$ /IFN- $\gamma$ ; TC\*: amostras tratadas com IFN- $\gamma$ .

#### 4.4. RT-PCR - análise dos níveis de expressão dos MRFs

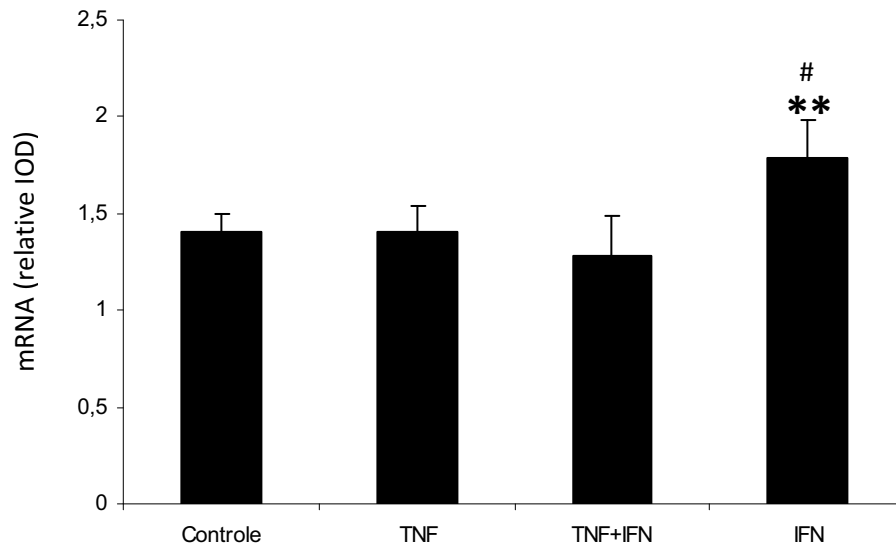
O RT-PCR é um método de análise semi-quantitativo. Todos os dados encontrados a partir deste experimento foram quantificados através da densitometria das bandas de cDNA amplificado pelos pares de primers específicos. Tais bandas foram obtidas de géis de agarose (figuras 3,5 e 7) referentes aos produtos das reações de PCR, os quais foram fotografados e então analisados.

Os resultados da densitometria de bandas foram usados para a realização dos cálculos estatísticos e os dados obtidos estão expressos nos gráficos das figuras 4, 6 e 8.

- **MyoD:** O tratamento com IFN aumentou a expressão do gene MyoD quando comparado aos grupos controle ( $p<0,05$ ) e TNF+IFN ( $p<0,01$ ) (Figuras 3 e 4).

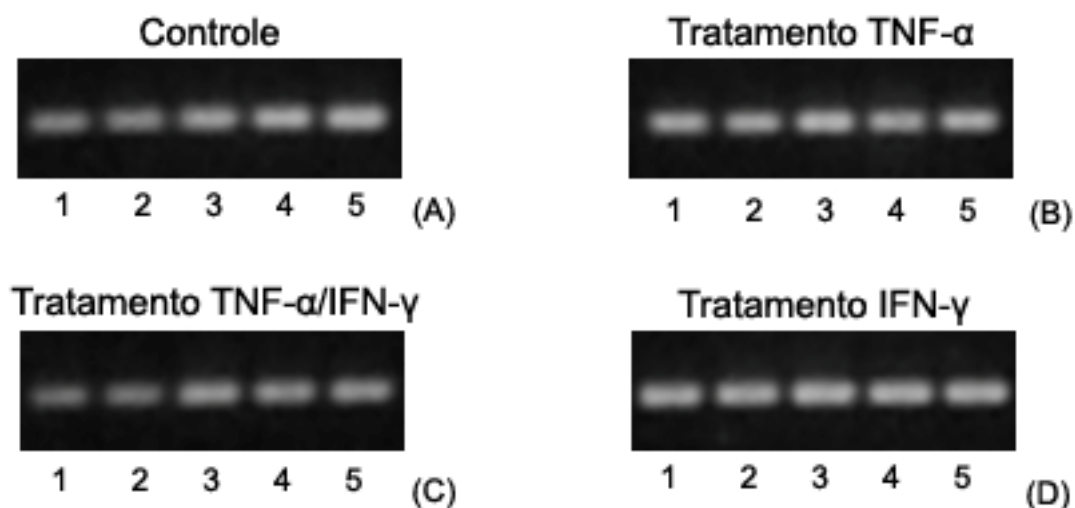


**Figura 3:** Expressão do gene MyoD, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe: (A): grupo controle; (B): grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); (C): grupo tratado com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/ml + 50 U/ml); (D): grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/ml).

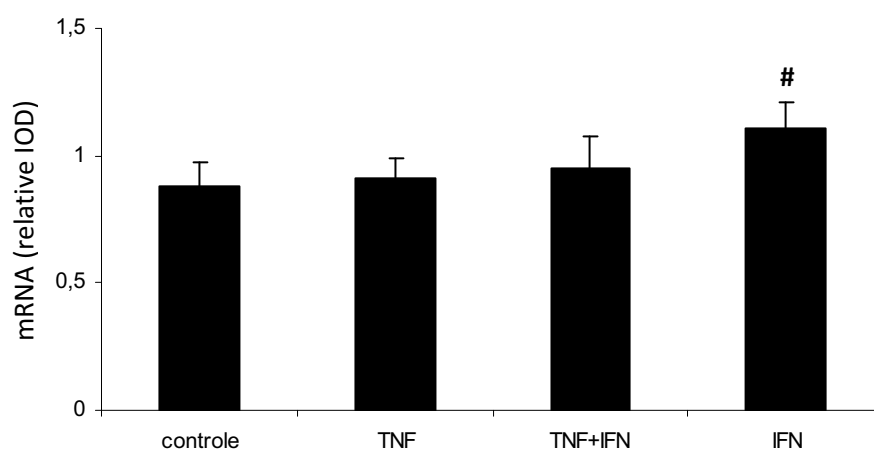


**Figura 4:** Expressão do gene MyoD, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Controle: grupo controle; TNF: grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); TNF+IFN: grupo tratado com TNF-  $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/ml + 50 U/ml); IFN: grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/ml). #: versus grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*: versus grupo TNF+IFN ( $p < 0,01$ ).

- **Miogenina:** O tratamento com IFN aumentou a expressão do gene miogenina quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figuras 5 e 6).

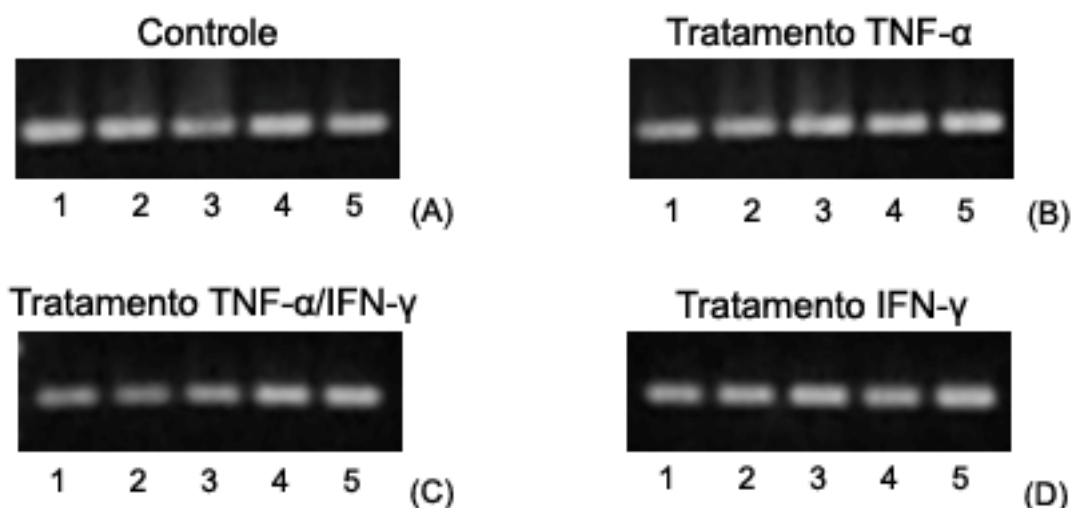


**Figura 5:** Expressão do gene Miogenina, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe: (A): grupo controle; (B): grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); (C): grupo tratado com TNF-  $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/ml + 50 U/ml); (D): grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/ml).

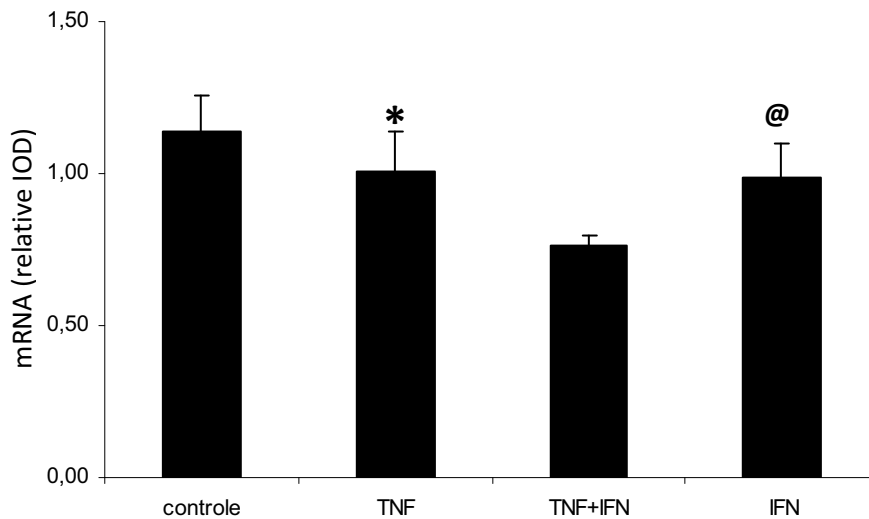


**Figura 6:** Expressão do gene Miogenina, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Controle: grupo controle; TNF: grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); TNF+IFN: grupo tratado com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/mL + 50 U/mL); IFN: grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/mL). #: versus grupo controle ( $p < 0,05$ ).

- **Myf5:** O tratamento com TNF+IFN diminuiu expressão do gene Myf5 quando comparado aos grupos TNF ( $p < 0,005$ ) e IFN ( $p < 0,05$ ) (Figuras 7 e 8).

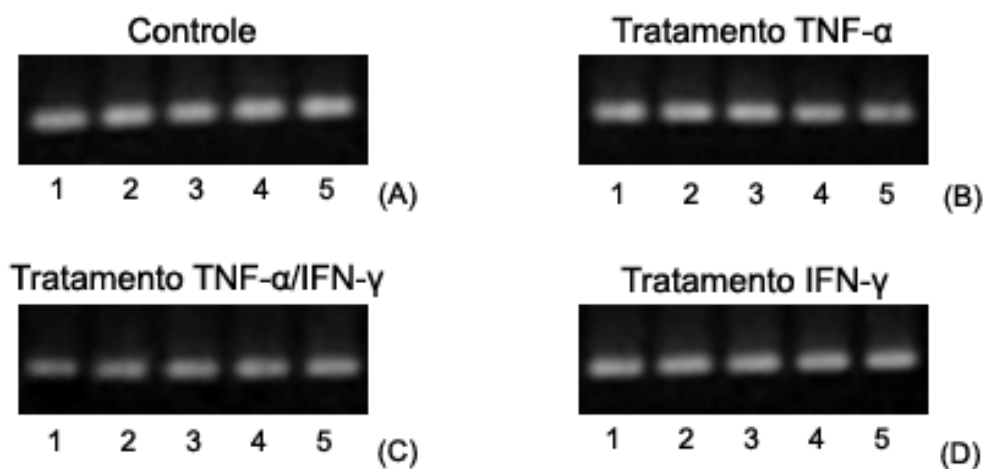


**Figura 7:** Expressão do gene Myf5, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe: (A): grupo controle; (B): grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); (C): grupo tratado com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/mL + 50 U/mL); (D): grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/mL).



**Figura 8:** Expressão do gene Myf5, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Controle: grupo controle; TNF: grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); TNF+IFN: grupo tratado com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/ml + 50 U/ml); IFN: grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/ml). \* e @: versus grupo TNF+IFN ( $p < 0,05$ ).

- **MRF-4:** A expressão gênica do MRF-4 na cultura de células não foi detectada em nenhum dos grupos analisados (dados não demonstrados).
- **GAPDH:** Foi usado para normalização dos valores referentes aos demais genes sendo detectado em todos os grupos experimentais com uma expressão igual (Figura 9).



**Figura 9:** Expressão do gene GAPDH, de células extraídas das culturas de mioblastos C2C12. Gel de agarose (1%) corado com SYBR safe: (A): grupo controle; (B): grupo tratado com TNF- $\alpha$  (5 ng/ml); (C): grupo tratado com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (5 ng/ml + 50 U/ml); (D): grupo tratado com IFN- $\gamma$  (50 U/ml).

## 5. DISCUSSÃO

A proposta desta investigação foi determinar a expressão de mRNA dos fatores de regulação miogênica, MyoD, Myf5, Miogenina e MRF-4 em culturas de mioblastos, C2C12 após diferenciação até estágio de miotubos, submetidos a tratamento com TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . As culturas de C2C12 foram expandidas até que fosse atingida uma confluência de 80% da superfície de plaqueamento, então estas células foram tratadas para se diferenciarem em miotubos. Ao atingir este nível de diferenciação as culturas foram submetidas ao tratamento com fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), e a associação do TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ .

Nossos resultados mostraram que o tratamento com IFN- $\gamma$  aumentou a expressão do gene MyoD quando comparado aos grupos controle e TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ , bem como aumentou a expressão do gene miogenina quando comparado ao grupo controle. A expressão do gene Myf5 também aumentou sob tratamento IFN- $\gamma$  comparado aos grupos TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A expressão gênica do MRF-4 na cultura de células não foi detectada em nenhum dos grupos analisados. Para a normalização dos valores dos genes acima citados foi utilizado o gene constitutivo GAPDH detectado em todos os grupos experimentais.

MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF-4 são conhecidos fatores de transcrição pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH). Esses fatores são músculo-específicos e regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas. MyoD e Myf5 são os fatores de regulação miogênica responsáveis pela proliferação dos mioblastos expressos anteriormente a fase de diferenciação destas células. A miogenina e o MRF-4 são fatores de regulação miogênica expressos nas células em final de diferenciação (Megeney & Rudnicki, 1995).

Neste trabalho MyoD, Myf5 e Miogenina apresentaram aumento de expressão em C2C12 tratadas com IFN- $\gamma$ . Estudos *in vitro* demonstraram que IFN- $\gamma$  e seus receptores são expressos em culturas de mioblastos C2C12 e que o bloqueio destes receptores causa uma redução na proliferação e fusão destas células (Cheng *et al.*, 2008). Em um estudo *in vivo*, camundongos transgênicos modificados para super-expressarem constitutivamente IFN- $\gamma$  apresentaram miopatias necrotizantes (Shelton *et al.*, 1999). Por outro lado, outro estudo demonstrou que com administração controlada e não constante de IFN- $\gamma$  exógeno ocorreu uma melhora aparente no processo de cicatrização de músculo esquelético lesado (Foster *et al.*, 2003).

Alguns estudos reportaram que o IFN- $\gamma$  exógeno tem influência na proliferação e diferenciação de culturas de mioblastos derivados de músculo humano, de galinha e de rato (Fisher *et al.*, 1983; Tomita & Hasegawa, 1984; Kalovidouris *et al.*, 1993; Kelic *et al.*, 1993). Estes estudos permitem inferir que, o tratamento das culturas de mioblastos C2C12 com IFN- $\gamma$  estimulou a proliferação e diferenciação dos mioblastos conforme demonstrado pelo aumento da expressão dos fatores MyoD, Myf5 e Miogenina em nosso estudo.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida por macrófagos ativados que se encontra elevada em diversas condições patológicas como na AIDS, cânceres e insuficiência cardíaca (Levin *et al.*, 1990; McMurrue *et al.*, 1991; Dukta *et al.*, 1993, Anker *et al.*, 1999).

Segundo trabalhos encontrados na literatura o TNF- $\alpha$  isoladamente inibe a expressão de fatores reguladores miogênicos como MyoD e miogenina em culturas de mioblastos C2C12 (Szalay *et al.*, 1997; Chandran *et al.*, 2007) e em culturas primárias de músculo esquelético (Larsen *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que a associação entre o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  reduz de forma mais acentuada a expressão da MyoD tanto em

culturas de mioblastos C2C12 como em músculo esquelético de camundongos (Acharyya *et al.*, 2004). No entanto, estes resultados contradizem os achados do presente estudo.

Os mecanismos pelos quais o TNF- $\alpha$  inibe a miogênese ainda são bastante discutíveis não havendo até o momento um consenso entre os pesquisadores. Um dos mecanismos bastante elucidado em alguns estudos está relacionado com a ativação da via do NF- $\kappa$ B pelo TNF- $\alpha$  (Guttridge *et al.*, 1999; Langen *et al.*, 2001; Langen *et al.*, 2004), por outro lado, alguns estudos defendem que o TNF- $\alpha$  é um sinalizador indispensável ao processo regenerativo (Chen *et al.*, 2005). Outro mecanismo potencial para explicar a perda de músculo esquelético é através da apoptose causada pelo TNF- $\alpha$  nos mioblastos (Foulstone *et al.*, 2001; Langen *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2004), no entanto, pouco se sabe sobre o efeito positivos ou negativos do TNF- $\alpha$  sobre miotubos (Tolosa *et al.*, 2005).

Em dados publicados por Tolosa em 2005, a exposição de culturas de mioblastos C2C12 diferenciados em miotubos ao TNF- $\alpha$  resultou em um aumento significativo na atividade da caspase-3, uma protease envolvida no processo de apoptose. Quando estas mesmas culturas foram expostas ao TNF- $\alpha$ , porém na presença de IFN- $\gamma$ , a atividade da caspase-3 foi plenamente revertida. Isso demonstra que o IFN- $\gamma$  tem um efeito protetor sobre a apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$  (Tolosa *et al.*, 2005).

Os resultados encontrados em nosso trabalho corroboram os resultados do trabalho acima referido. Todos os fatores miogênicos analisados, com exceção do MRF-4, tiveram um aumento na expressão de mRNA quando tratados com IFN- $\gamma$ . Tais dados demonstram que o IFN- $\gamma$  apresenta um efeito de proteção sobre mioblastos de C2C12 diferenciados em miotubos, contradizendo relatos que defendem o IFN- $\gamma$  como um regulador positivo do TNF- $\alpha$ .

O fator MRF-4 não foi detectado em nenhuma das amostras de RNA obtidas a partir das culturas de mioblastos C2C12 utilizadas para a realização deste trabalho. Uma possível explicação para essa situação é que o *primer* utilizado para o fator MRF-4 tenha sido desenhado com algum erro crucial na seqüência de nucleotídeos, ou ainda o armazenamento e forma de uso tenham prejudicado de alguma forma sua atividade, dado que na literatura, outros trabalhos identificam níveis de expressão deste fator em culturas de mioblastos C2C12 (te Pas *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2007).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o IFN- $\gamma$  exógeno administrado à culturas de mioblastos de C2C12 diferenciados em miotubos tem influência sobre a proliferação e diferenciação destas culturas. Este dados foi expresso pelo aumento na quantidade de mRNA dos fatores miogênicos MyoD, Myf5 e miogenina, corroborando à hipótese do efeito protetor desta citocina sobre a inibição da expressão de fatores miogênicos causados pelo aumento do TNF- $\alpha$  em diversas condições patológicas.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A formação universitária não se resume apenas a aulas, provas e notas. Paralelamente a este processo, que é fundamental, estão as relações interpessoais, as quais remetem a um aprendizado complementar ao processo de graduação. Através destas relações é que se torna possível descobrir muitos dos interesses que vão nortear o caminho que está em construção.

O desenvolvimento de um trabalho científico também se baseia nestes preceitos. O aprendizado teórico dá embasamento e consistência ao que se deseja estudar. As relações interpessoais facilitam todo o processo de aprendizado, principalmente na aquisição dos conhecimentos relativos ao dia a dia de um laboratório.

Neste sentido realizar o presente trabalho, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas traz não apenas um título ao currículo, mas sim toda uma vivência. Além de proporcionar condições para a continuidade de um trabalho futuro como pesquisador, ainda acrescenta de forma muito significativa conhecimentos indispensáveis à formação do caráter de um futuro profissional graduado por esta instituição.

O projeto realizado permitiu um amplo aprendizado sobre o dia a dia de trabalho de um pesquisador, tanto em um sentido de aprendizagem teórica, como técnica. Esses conhecimentos somados permitem hoje o início de uma autonomia indispensável para a seqüência da carreira aqui escolhida.

Sem mais, julgo que o desenvolvimento deste projeto, somado a todos os momentos vividos em função dele possibilitarão um futuro muito promissor dado a escolha de uma carreira científica a ser trilhada deste momento em diante.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, Guttridge DC (2004) Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. **J Clin Invest** 114: 370-378.
- Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, Iyeva F, Rauchhaus M, Kemp M, Teixeira MM, Hellewell PG, Hoopert J, Poole-Wilson PA, Coats AJS (1999) Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. **Eur Heart J** 20: 683-693.
- Bigard X, Boehm E, Veksler V, Mateo P, Anflous K, Ventura-Clapier R (1998) Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 30: 2391-2401.
- Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Pais-Silva MD (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **Int J Exp Path** 84: 201–206.
- Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, Agarwal S. (2007) Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. **Am J Physiol Cell Physiol** 293(1):C267-76.
- Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, Koh TJ. (2008) Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. **Am J Physiol Cell Physiol** 294(5): C1183-91.
- Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP. (2005) Role of TNF- $\alpha$  signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. **Am J Physiol Cell Physiol** 289(5):C1179-87.
- Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE (1997) The epidemiology of heart failure. **Eur Heart J** 18: 208-225.

- De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R (2000) Heart failure affects mitochondrial but not intrinsic properties of skeletal muscle. **Circulation** 102: 1847-1853.
- Dutka DP, Elborn JS, Delamere F, Shale DJ, Morris GK. (1993) Tumor necrosis factor  $\alpha$  in severe congestive cardiac failure. **Br Heart J** 70: 141–3.
- Fisher PB, Miranda AF, Babiss LE, Pestka S, Weinstein IB. (1983) Opposing effects of interferon produced in bacteria and of tumor promoters on myogenesis in human myoblast cultures. **Proc Natl Acad Sci** 80: 2961–2965.
- Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. (2003) Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. **J Orthop Res** 21: 798–804.
- Foulstone EJ, Meadows KA, Holly JM, Stewart CE. (2001) Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) inhibit C2 skeletal myoblast differentiation and enhance TNF  $\alpha$ -induced apoptosis. **J Cell Physiol** 189(2):207-15.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. (1999) NF- $\kappa$ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. **Mol Cell Biol** 19(8):5785-99.
- Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJS (1997) Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol** 30: 1758-1764.
- Hughes SM, Koyshi K, Rudnicki M, Maggs AM (1997) MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. **Mech Dev** 61: 151-163.
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and Myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. **Development** 118: 1137-1147.
- Jin X et al. (2007) Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun** 364(3):476-82.

- Kalovidouris AE, Plotkin Z, Graesser D. (1993) Interferon-gamma inhibits proliferation, differentiation, and creatine kinase activity of cultured human muscle cells. II. A possible role in myositis. **J Rheumatol** 20: 1718–1723.
- Kelic S, Olsson T, Kristensson K. (1993) Interferon-gamma promotes proliferation of rat skeletal muscle cells in vitro and alters their AChR distribution. **J Neurol Sci** 114: 62–67.
- Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. (2001) Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **FASEB J** 15(7):1169-80.
- Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. (2004) Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. **FASEB J** 18(2):227-37.
- Larsen AE, Cameron-Smith D, Crowe TC. (2008) Conjugated linoleic acid suppresses myogenic gene expression in a model of human muscle cell inflammation. **J Nutr** 138(1):12-6.
- Levin B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N Engl Med** 323: 236–41.
- Lipkin DP, Jones DA, Round JM, Poole-Wilson PA. (1988) Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **Int J Cardiol** 18(2):187-95.
- Mancini DM, Walter G, Reichek N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR (1992) Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation** 85: 1364-1373.
- McMurray J, Abdullah I, Dargie HJ, Shapiro D. (1991) Increased concentrations of tumor necrosis factor in ‘cachectic’ patients with severe chronic heart failure. **Br Heart J** 66: 356–8.
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem Cell Biol** 73(9-10): 723-732.

- Mozdziak PE, Geaser ML, Schultz E (1998) Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. **J Apply Physiol** 84 (4): 1359-1364.
- Mozdziak PE, Geaser ML, Schultz E (1999) Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain expression following hindlimb suspension. **Aviat Space Environ Med** 70 (5): 511-516.
- Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell** 58: 537-544.
- Poehlman ET (1999) Special consideration in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. **J Nutr** 129: 260S –263S.
- Poole-Wilson PA, Ferrari R (1996) Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 28: 2275-2285.
- Seward DJ, Haney JC, Rudnicki MA, Swoap SJ (2001) bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. **AM J Physiol Cell Physiol** 85: C408-413.
- Shelton GD, Calcutt NA, Garrett RS, Gu D, Sarvetnick N, Campana WM, Powell HC. (1999) Necrotizing myopathy induced by overexpression of interferon-gamma in transgenic mice. **Muscle Nerve** 22: 156–165.
- Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M, Samarel AM. (1996) Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 28(8):1683-91.
- Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH. (2002) Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. **Eur J Appl Physiol** 87(2):182-6.

- Stewart CE, Newcomb PV, Holly JM. (2004) Multifaceted roles of TNF-alpha in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. **J Cell Physiol** 198(2):237-47.
- Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR (1990) Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation** 81: 518-527.
- Szalay K, Rázga Z, Duda E. (1997) TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin. **Eur J Cell Biol** 74(4):391-8.
- te Pas MF, de Jong PR, Verburg FJ. (2000) Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. **Mol Biol Rep** 27(2):87-98.
- Tolosa L, Morlá M, Iglesias A, Busquets X, Lladó J, Olmos G. (2005) IFN-gamma prevents TNF-alpha-induced apoptosis in C2C12 myotubes through down regulation of TNF-R2 and increased NF-kappaB activity. **Cell Signal** 17(11):1333-42.
- Tomita Y, Hasegawa S. (1984) Multiple effects of interferon on myogenesis in chicken myoblast cultures. **Biochim Biophys Acta** 804: 370–376.
- Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, Dalla Libera L (1998a) Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline – induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. **Cardiovascular Res** 39: 233 – 241.
- Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. **Dev Dynam** 198: 214-224.
- Wilson JR (1996) Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 28: 2287–2292.