

Aline Regina Ruiz Lima

**Estudo do Músculo Diafragma em Ratos
com Insuficiência Cardíaca Crônica:
Composição das Miosinas e Expressão
dos Fatores de Regulação Miogênica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

**Botucatu – São Paulo
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Lima, Aline Regina Ruiz.

Estudo do músculo diafragma em ratos com insuficiência cardíaca crônica:
composição das miosinas e expressão dos fatores de regulação miogênica /
Aline Regina Ruiz Lima. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade-de
Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Marina Politi Okoshi

Co-orientador: Katashi Okoshi

Assunto CAPES: 40101100

1. Insuficiência cardíaca crônica 2. Coração - Doenças

Palavras-chave: Diafragma; Fatores de regulação miogênica; Infarto do
miocárdio; Insuficiência cardíaca; Miosina

“TENHO EM MIM TODOS OS SONHOS DO MUNDO.”
Fernando Pessoa

“QUANTO MAIS ACREDITO NA CIÊNCIA, MAIS
ACREDITO EM DEUS.”
Albert Einstein

Dedicatória

À MINHA FAMÍLIA e ao meu namorado,
tão amados, e aos meus amigos do
laboratório. Sem vocês, eu simplesmente
não conseguiria.

Agradecimento Especial

Agradeço à Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela competência na orientação, paciência, dedicação, delicadeza em todos os momentos, por acreditar na minha capacidade, por ter me dado as ferramentas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, por seus valiosos ensinamentos... A senhora foi fundamental no meu amadurecimento científico. Muito obrigada!

Agradecimentos

A DEUS, simplesmente TUDO, por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, SIMÃO e REGINA, meus exemplos, pelo amor incondicional, por me darem todas as oportunidades necessárias para meu crescimento pessoal e profissional, sempre apoiando e torcendo por minha felicidade. Amo vocês!

Aos meus irmãos, FELIPE, KARLA e LÍVIA, amores da minha vida, pelo amor, pelo apoio em todas as etapas da minha vida, por serem aqueles que eu sei que sempre estarão ali.

À minha querida bisavó MERCEDES, a matriarca da família, que sempre me apoiou a continuar estudando e me encheu de amor e carinho.

Aos meus avós queridos RAFAEL e CIDA, por todo o amor e incentivo, sempre torcendo por mim.

À minha avó MARIA, pelo carinho.

Ao meu querido avô MÁRIO (*in memoriam*), nosso sábio, por ser tão amável, incentivador e ter preenchido nossos dias de carinho.

A todos os meus TIOS e PRIMOS, pelo afeto e alegria.

Ao meu namorado JONAS, por estar sempre ao meu lado, torcendo por mim, apoiando, incentivando, suportando os momentos de estresse, consolando nos momentos de desespero e comemorando comigo cada pequena conquista do dia-a-dia... Seu amor é fundamental!

A todos os meus AMIGOS queridos, em todas as cidades pelas quais passei, por terem feito parte da minha vida, fazendo de mim o que sou hoje e que, mesmo longe, estão sempre presentes.

Aos PROFESSORES DA UNESP de Botucatu, por sempre estarem dispostos a ensinar, por terem sido verdadeiros mestres.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela co-orientação nesse trabalho, pelo estudo do ecocardiograma, pela disponibilidade e pela gentileza com que sempre esclareceu minhas dúvidas.

À Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA, pela disponibilidade e simpatia, sempre esclarecendo as dúvidas e ensinando muito do que sei sobre musculatura esquelética, por ter sido parte da banca do exame de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF, pela indução do infarto experimental, contribuição valiosa na realização deste trabalho, e por ser sempre tão solícito e gentil.

Ao Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI, pela amizade desenvolvida no laboratório, sempre alegre e simpático, e por ter sido parte da banca do exame de qualificação, contribuindo com valiosas sugestões para este trabalho.

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, por todo cuidado que sempre demonstrou, o carinho e os constantes estímulos ao estudo e à pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório Experimental de Clínica Médica, CAMILA ROSA, NATASHA, CAMILA GIMENEZ, GABRIEL, LORENA, ARTHUR, LOUISE, ARIANE, BRUNO, DÉBORA, DANI, RENATA, ANDRÉ NASCIMENTO, MIRIANE, REGIANE, LIDIANE, FERNANDA, DANI, PAULINHA, ADRIANA, DENISE, CARLOS, ALBANO, FABIANA, MARIELE, JULIANA, CAROL, PAULO, JOSÉ CARLOS, MÁRIO BRUNO, SANDRA, SUELI CLARA, ELENIZE, CAMILA, CORINA, SUELI GARCIA, DE LALLA, JOSÉ APARECIDO, ÂNGELO, ROGÉRIO, VITOR, MARTA, pela colaboração na elaboração deste trabalho, ótima convivência e bons momentos.

Aos amigos do laboratório (e da vida) PAULA, SILVIO, RICARDO, MARCELO, DANI GUIZONI, CAMILA BONOMO, DIJON, MARIA TERESA, ANA PAULA, ANDRÉ LEOPOLDO, por terem sido essenciais na elaboração deste trabalho, sempre dispostos a ajudar e ensinar, por terem sido, acima de tudo, amigos. Sem vocês, certamente não conseguiria passar essa etapa!

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica ANA MENGUE, ALEXANDRE, BRUNO, ELISÂNGELA, LAURA, RENATO, MARCEL, pela dedicação e simpatia, sempre dissolvendo as dificuldades.

Ao MÁRIO, do Departamento de Clínica Médica, pela ajuda na formatação deste trabalho, pela disponibilidade em ajudar e por sempre me receber com simpatia.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FMB, pela dedicação e simpatia, por serem muito ágeis na resolução dos problemas.

ÀS MOÇAS DA LIMPEZA, por sempre manterem o laboratório e todas as dependências da faculdade aseados para podermos trabalhar e estudar com

conforto.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP),
pelo auxílio financeiro (processo 2007/57499-6).

A TODAS AS PESSOAS que fizeram parte da minha vida, contribuindo para
minha formação profissional e pessoal.

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Objetivos	13
Material e Métodos	15
Resultados	24
Discussão	45
Referências Bibliográficas	52

Resumo

Estudos clínicos e experimentais têm sugerido que anormalidades da musculatura esquelética podem colaborar para a ocorrência precoce de dispnéia e fadiga em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Em músculos periféricos e respiratórios, freqüentemente observa-se modificação na composição das cadeias pesadas da miosina (MyHC) na insuficiência cardíaca. Os mecanismos e vias intracelulares de sinalização responsáveis pela alteração das MyHCs ainda não estão completamente definidos. Na insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina, foi verificado que a expressão dos fatores de regulação miogênica está associada a alterações no fenótipo das MyHC. Recentemente, foi verificado que o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) pode modular a expressão de proteínas miofibrilares. Não identificamos estudos que avaliaram o papel dos fatores de regulação miogênica e a influência do TNF- α na composição das MyHCs no músculo diafragma durante a insuficiência cardíaca. O objetivo deste estudo é determinar se modificações nas isoformas das MyHCs são relacionadas a alterações na expressão gênica dos fatores de regulação miogênica no músculo diafragma de ratos com infarto do miocárdio, com e sem insuficiência cardíaca. Adicionalmente, verificamos se as concentrações séricas de TNF- α e de IL-6 estão relacionadas a alterações das MyHCs e da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica. Métodos: insuficiência cardíaca foi induzida por infarto do miocárdio. Seis meses após a cirurgia, foram constituídos três grupos de animais: Sham (n=10), IM/IC- (animais infartados com disfunção ventricular e sem insuficiência cardíaca, n=10) e IM/IC+ (animais infartados com insuficiência cardíaca, n=10). As estruturas cardíacas e a função ventricular foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico. As isoformas das MyHCs foram analisadas por eletroforese de proteínas. A área seccional das fibras musculares foi mensurada em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina e submetidos à reação NADH-TR. A expressão gênica dos fatores de regulação miogênica miogenina, MyoD e MRF4 foi avaliada por RT-PCR em tempo real e as concentrações séricas de TNF- α e interleucina-6 foram quantificadas por ELISA. Análise estatística foi realizada por Anova e a associação entre as variáveis foi verificada pela correlação de Pearson. O nível de significância foi de 0,05. Resultados: A avaliação ecocardiográfica mostrou que o grupo IM/IC- apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do

ventrículo esquerdo, quando comparado ao Sham. O comprometimento cardíaco foi maior no grupo IM/IC+ que no IM/IC-. A área seccional das fibras foi semelhante entre os grupos. A porcentagem da isoforma I das MyHCs foi maior no grupo IM/IC+ em comparação ao IM/IC- e a porcentagem da isoforma Iib foi menor no grupo IM/IC+ que no Sham. O diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal foi positivamente correlacionada com a porcentagem da isoforma I das MyHCs e negativamente relacionado com a porcentagem da isoforma Iib das MyHCs. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão dos fatores de regulação miogênica miogenina, MyoD e MRF4 entre os grupos. A concentração sérica de TNF- α e de interleucina-6 foi maior no grupo IM/IC+ que no sham. A concentração sérica de TNF- α foi diretamente correlacionada com a porcentagem da isoforma I das MyHCs. Em conclusão, a expressão gênica dos fatores de regulação miogênica não parece modular a composição das cadeias pesadas de miosina do músculo diafragma na insuficiência cardíaca crônica induzida por infarto do miocárdio. As alterações das isoformas das cadeias pesadas de miosina do músculo diafragma são relacionadas ao grau de disfunção ventricular e à concentração sérica de TNF- α .

Abstract

Several clinical and experimental studies have suggested that skeletal muscle abnormalities can contribute to early fatigue and dyspnea in heart failure patients. Changes of myosin heavy chain (MyHC) isoforms have been frequently observed in peripheral and respiratory muscles during heart failure. Pathophysiological mechanisms and intracellular signaling pathways involved on MyHCs alterations are not completely defined. In monocrotaline-induced right heart failure, it was observed that the expression of myogenic regulatory factors is associated with MyHCs phenotype changes. Tumoral necrosis factor-alpha (TNF- α) has been recently described to modulate skeletal myofibril proteins. We did not find studies evaluating the influence of myogenic regulatory factors and TNF- α serum concentration on diaphragm MyHC isoforms during heart failure. In this study we tested the hypothesis that diaphragm MyHC isoforms changes are related to myogenic regulatory factors gene expression in chronic heart failure. Additionally, we measured TNF- α and interleukin-6 serum levels to examine their correlation with both MyHC isoforms and myogenic regulatory factors gene expression. Methods: A coronary ligation model was employed to induce heart failure. Six months after the surgical procedure, three groups of rats were studied: Sham (n=10), infarcted rats without heart failure (MI/HF-, n=10), and infarcted rats with heart failure (MI/HF+, n=10). Cardiac structures and ventricular function were assessed by transthoracic echocardiogram. MyHC isoforms were analyzed by protein electrophoresis. Muscle fiber cross-sectional area was measured in hematoxylin-eosin stained sections and in sections submitted to NADH-TR reaction. Myogenic regulatory factors miogenin, MyoD, and MRF4 gene expression was evaluated by real time RT-PCR; TNF- α and interleukin-6 serum levels were quantified by ELISA. Statistical analysis was performed by ANOVA and association between variables by the Pearson correlation. Significant level was 0.05. Results: In echocardiographic evaluation, MI/HF- presented left cardiac chambers dilation and left ventricular systolic and diastolic dysfunction compared to the Sham group. Cardiac alterations were more pronounced in the MI/HF+ than in MI/HF-. Fiber cross-sectional areas were similar between groups. MyHC I isoform was higher in MI/HF+ than MI/HF- group and the Iib isoform was lower in MI/HF+ than the Sham. Left atrium diameter normalized to body weight was positively correlated with MyHC I isoform and negatively correlated with MyHC Iib

isoform. No difference was observed in myogenic regulatory factors miogenin, MyoD, and MRF4 gene expression between groups. TNF- α and interleukin-6 serum levels were higher in MI/HF+ than the Sham group. TNF- α levels were directly correlated to the MyHC I isoform. In conclusion, myogenic regulatory factors gene expression does not modulate diaphragm myosin heavy chain isoforms in rats with chronic heart failure. Diaphragm myosin heavy chain changes are related to ventricular dysfunction severity and TNF- α serum levels.

Introdução

A insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se, clinicamente, por diminuição da capacidade para exercícios físicos e atividades cotidianas devida à ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatologia ainda não está completamente definida ¹⁻⁷. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para exercícios físicos fosse causada por diminuição da função cardíaca e pulmonar e por alteração da perfusão tecidual decorrente de queda do débito cardíaco. Entretanto, a suposição inicial de que a capacidade para exercícios pudesse relacionar-se diretamente com a função ventricular não se confirmou, tendo sido observada pobre correlação entre variáveis hemodinâmicas e tolerância ao exercício em doentes com insuficiência cardíaca ⁸.

Mais recentemente, foi aventado que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética periférica ⁹ também pudessem ter papel importante na determinação da capacidade para realizar exercícios físicos em doentes com insuficiência cardíaca crônica. Em estudos clínicos e experimentais, foram verificadas alterações metabólicas, morfológicas, moleculares e funcionais em músculos esqueléticos periféricos durante a insuficiência cardíaca crônica ^{2-6,8-16}. O conjunto das alterações musculares que ocorrem em doentes com insuficiência cardíaca crônica foi denominado de miopatia associada à insuficiência cardíaca.

O tecido muscular é formado por células especializadas, alongadas e multinucleadas, chamadas fibras musculares, que possuem a capacidade de contração. Estas células são rodeadas por matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constitui o tecido conjuntivo do músculo. O tecido muscular é organizado em três envoltórios distintos: o epimísio, que envolve todo o músculo, o perimísio, que divide fascículos musculares, e o endomísio, que circunda cada fibra. O sarcômero, unidade contrátil fundamental da fibra muscular, é constituído por proteínas estruturais e contráteis. Entre as proteínas contráteis, destaca-se a miosina, hexâmero formado por duas cadeias pesadas (MyHC, do inglês myosin heavy chain) e duas cadeias leves. As cadeias pesadas da miosina apresentam uma porção globular com atividade ATPásica, cujo padrão define os tipos de isoformas das MyHC ¹⁷. Os músculos esqueléticos de ratos adultos apresentam uma isoforma lenta e três isoformas rápidas de MyHC. A isoforma lenta é denominada MyHC I e as três

isoformas rápidas são MyHC IIa, MyHC IID, também denominada MyHC IIX, e MyHC IIB ¹⁸. As fibras histoquimicamente denominadas como tipo I, de contração lenta, expressam MyHC I e as fibras rápidas IIA, IID e IIB expressam MyHC IIa, MyHC IID e MyHC IIB, respectivamente ¹⁹. De acordo com a composição das isoformas das cadeias pesadas de miosina, as fibras musculares podem ser definidas como rápidas ou lentas. As fibras que expressam apenas uma isoforma de MyHC são denominadas fibras puras e constituem a maioria das fibras musculares. São encontradas também, em condições normais, fibras híbridas, que co-expressam mais de uma isoforma de MyHC.

A análise histoquímica dos músculos permite determinar a atividade metabólica de enzimas mitocondriais, por meio da reação histoquímica NADH-TR (adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase), e da enzima ATPásica e, assim, identificar as fibras como de contração lenta e metabolismo oxidativo, de contração rápida e metabolismo glicolítico, e de contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico ²⁰. Os músculos estriados são constituídos por diversos tipos de fibras, cujas características morfológicas, metabólicas e funcionais podem apresentar variações dependentes de estímulos como hipóxia, estimulação elétrica, imobilização e exercício físico ²¹⁻²⁶.

Na insuficiência cardíaca crônica, uma das alterações freqüentemente observada em estudos clínicos ^{27,28} e experimentais é a modificação da composição das cadeias pesadas de miosina das fibras musculares esqueléticas ^{14,29,30}. Observa-se aumento das fibras tipo II, rápidas, e redução das fibras tipo I, lentas, nos músculos periféricos. Interessantemente, essas alterações do fenótipo muscular estão presentes também na fase de hipertrofia cardíaca compensada ¹⁴, o que sugere que podem ser mediadas por fatores bioquímicos e/ou neurohormonais associados ao quadro de injúria do coração e não estão diretamente relacionadas à presença de insuficiência cardíaca.

Alterações de músculos respiratórios também foram observadas na insuficiência cardíaca e responsabilizadas, pelo menos parcialmente, pela ocorrência precoce de dispnéia e fadiga aos esforços ³¹⁻³⁴. No músculo diafragma, tanto em estudos clínicos como em modelos experimentais de falência cardíaca, foram verificadas anormalidades histológicas, atrofia das fibras musculares, alterações enzimáticas, diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial, aumento do estresse

oxidativo e alteração da força de contração muscular ^{6,32,35-43}. Também no músculo diafragma, uma das alterações frequentemente encontrada e que pode contribuir para a disfunção diafragmática é a modificação na composição das MyHC. Durante a insuficiência cardíaca, ocorre aumento na frequência das fibras tipo I, de contração lenta, e diminuição na proporção das fibras tipo II, de contração rápida ^{35,42,44,45}. No diafragma, a alteração da composição das MyHC ocorre em sentido inverso à que se observa na musculatura esquelética periférica na insuficiência cardíaca. A diferença de comportamento entre os músculos esqueléticos periféricos e o diafragma se deve, provavelmente, à sobrecarga de trabalho a que o diafragma está submetido na insuficiência cardíaca em decorrência de edema pulmonar intersticial ⁴⁴.

As causas responsáveis pelas alterações das isoformas das MyHCs na insuficiência cardíaca não estão ainda completamente definidas. Acredita-se que ativação sistêmica de neurohormônios e de citocinas inflamatórias que acompanha o desenvolvimento da insuficiência cardíaca possa estar envolvida nessas alterações ⁴⁶. Também não são conhecidos os mecanismos moleculares e as vias sinalizadoras que controlam a expressão gênica das MyHCs nos músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca.

Há substancial evidência que os fatores de regulação mio gênica (MRF) MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 atuam como importantes reguladores da expressão de proteínas musculares ^{16,47-50}. Os MRF são fatores transcricionais que ativam a expressão de genes específicos do músculo por meio de ligação a elementos de controle no DNA, conhecidos como E-box, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos. A MyoD e a miogenina estão envolvidas na manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, rápido ou lento. A MyoD é expressa em maior quantidade que a miogenina em músculos rápidos enquanto o oposto ocorre em músculos lentos ^{47,48,51}. Na miogênese, os fatores de regulação mio gênica regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células mio gênicas. Os primeiros fatores expressos são a MyoD e o Myf-5, importantes para a proliferação dos mio blastos, antecedendo a fase de diferenciação. A miogenina e o MRF4 são expressos posteriormente, em células no final do processo de diferenciação, e regulam esta fase da fibra muscular ⁴⁹.

Apesar da importância dos MRF no fenótipo de proteínas musculares, poucos autores avaliaram sua expressão muscular na insuficiência cardíaca. Em ratos com insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina, a alteração das MyHCs do diafragma foi associada a redução da expressão gênica da MyoD ⁴⁵. Entretanto, como esse modelo experimental cursa com insuficiência cardíaca direita e de desenvolvimento rápido, não é conhecido se esses achados são válidos para modelo experimental de insuficiência cardíaca esquerda crônica, semelhante à que ocorre comumente nos casos de insuficiência cardíaca em humanos.

Recentemente, foi aventado que o aumento das concentrações séricas de citocinas inflamatórias que ocorre durante a insuficiência cardíaca crônica ⁵², especialmente do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), pode estar envolvido nas alterações da musculatura esquelética ⁵³. O TNF- α é capaz de ativar o fator nuclear Kappa B (NF- κ B), uma família de cinco fatores transcricionais que estão envolvidos em vários processos celulares como apoptose, imunidade e inflamação, diferenciação e desenvolvimento ⁵⁴. Por meio de associação com a proteína I κ B, o NF- κ B encontra-se normalmente inativo no citoplasma ⁵⁵. A ativação do receptor da membrana plasmática do TNF- α leva à fosforilação da I κ B, que é então ubiquitinizada para posterior degradação proteossomal ⁵⁶. A degradação da I κ B permite a ativação e a translocação de heterodímeros de NF- κ B para o núcleo celular ⁵⁷. O aumento de NF- κ B induzido pelo TNF- α leva à diminuição da expressão de RNA mensageiro para a MyoD, com consequente alteração na síntese de MyHCs ⁵⁸. Embora esses dados mostrem o papel potencial do TNF- α em modular proteínas músculo-específicas durante a insuficiência cardíaca, não há estudos sobre a relação entre concentração sérica de TNF- α e alterações das MyHCs ou dos MRF nessa condição.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina capaz de mediar respostas imunes e inflamatórias. Estímulos para sua secreção incluem o aumento da concentração de TNF- α ou da interleucina-1, por meio da via do NF- κ B ⁵⁹. Embora poucos estudos tenham analisado o estado da IL-6 na insuficiência cardíaca, foi sugerido que o aumento de sua concentração sérica está associado a desequilíbrio do anabolismo/catabolismo observado na insuficiência cardíaca ^{10,60,61}. Não identificamos estudos sobre o comportamento da IL-6 na miopatia associada à insuficiência cardíaca.

Neste trabalho testamos a hipótese que, na insuficiência cardíaca, alterações na composição das cadeias pesadas de miosina do músculo diafragma estão relacionadas a anormalidades na expressão gênica dos fatores de regulação miogênica e a aumento na concentração sérica do TNF- α .

Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Determinar se modificações nas isoformas das cadeias pesadas de miosina estão relacionadas a alterações na expressão gênica dos fatores de regulação miogênica no músculo diafragma de ratos com infarto do miocárdio, nas fases de disfunção ventricular compensada e de insuficiência cardíaca.
2. Verificar se as concentrações séricas de TNF- α e de IL-6 estão relacionadas a alterações das cadeias pesadas da miosina e da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica.

Material e Métodos

Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos de luminosidade (12 h) controlados, e foram alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum*.

O infarto agudo do miocárdio foi induzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório ⁶². Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mono-nylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com algodão 10. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto.

Foram constituídos, inicialmente, dois grupos de animais: controle (Sham, n=10) e infarto do miocárdio (IM). No momento da eutanásia, seis meses após a indução do infarto, os ratos com IM foram subdivididos em dois grupos: com e sem insuficiência cardíaca, denominados IM/IC+ e IM/IC-, respectivamente. Para o diagnóstico de insuficiência cardíaca, foram avaliados os seguintes sinais clínico e anátomo-patológicos: taquipnéia, ascite, derrame pleural e pericárdico, trombos em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito (peso do ventrículo direito/peso corporal $> 0,8 \text{ mg/g}$) e congestão pulmonar (peso do pulmão > 2 desvios padrão acima da média do grupo Sham) ⁶³⁻⁶⁸. Os ratos com hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar foram alocados no grupo IM/IC+ (n=10). Os ratos sem quaisquer dos sinais de insuficiência cardíaca constituíram o grupo IM/IC- (n=10). Os demais animais foram excluídos desse estudo (n=7).

No final do experimento, os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Os ratos foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi coletado e centrifugado a

4°C. Amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80°C para posterior dosagem de citocinas inflamatórias. O coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios foram removidos e os ventrículos direito e esquerdo pesados separadamente. A seguir, as porções costais esquerda e direita do diafragma foram dissecadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80°C.

Avaliação morfológica e funcional do coração pelo ecocardiograma

Seis meses após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg), por via intraperitoneal para o estudo ecocardiográfico. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma utilizando-se equipamento da Philips, modelo HDI-5000 (Washington, USA), dotado de transdutor multifrequencial de 5,0 a 12,0 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis estruturais e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório ⁶⁹⁻⁷¹. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography ⁷² e já validadas no modelo de ratos infartados ⁷³. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos.

Análise morfológica do coração

Para caracterizar o grau de comprometimento do coração pelo infarto do miocárdio, foi realizada a mensuração do tamanho do infarto. O VE foi mantido em solução de formol a 10% por 24 h. A seguir, foi lavado em água corrente por 24 h e transferido para solução com etanol 70%. Foi realizado corte transversal do VE a 6 mm do ápice para a base; esse corte reflete a média dos resultados de cortes de todo o ventrículo ^{74,75}. O tecido miocárdico foi incluído em parafina, seccionado em

cortes histológicos de 4 µm e corado em lâmina com solução de hematoxilina-eosina. O tamanho do infarto foi mensurado com auxílio de microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram medidos os comprimentos epicárdico e endocárdico dos segmentos infartado e não infartado e calculada a porcentagem de comprimento infartado em relação ao comprimento total do VE ⁷⁶.

Análise morfológica e histoquímica do músculo diafragma

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido muscular foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20°C), onde permaneceram por 20 a 30 minutos para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras musculares. A seguir, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A avaliação da área seccional das fibras musculares foi realizada em microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Em cada lâmina, foram mensuradas as áreas seccionais transversas de, pelo menos, 200 fibras do músculo diafragma ⁷⁷.

Para a mensuração da área de acordo com o tipo de fibra muscular, foi utilizada a reação histoquímica da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio reductase (NADH-TR), que indica a presença e o grau de atividade oxidativa. Esta reação permite separar as fibras em até três tipos: as oxidativas, que apresentam reação intensa, as glicolíticas, que mostram reação fraca, e as oxidativas/glicolíticas, que apresentam reação moderada. Devida à dificuldade na classificação das fibras oxidativas/glicolíticas, estas foram excluídas da análise. A área seccional das fibras foi avaliada utilizando a técnica de Pearse modificada por Dubowitz & Brooke ⁷⁸. Para cada animal, foram analisados oito campos contendo, em média, total de 100 a 200 fibras.

Avaliação das isoformas das cadeias pesadas da miosina por eletroforese

A análise das isoformas das cadeias pesadas da miosina foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Fragmentos congelados do diafragma (80 a 100 mg) foram homogeneizados em Polytron, sob imersão em gelo, com solução de extração de proteína contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH= 7,0), sacarose 0,3 M, ditioneitol (DTT) 0,5 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM (pH= 8,0), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,3 mM, fluoreto de sódio (NaF) 10 mM e inibidor de protease (diluição final 1:100). Em seguida, as amostras foram centrifugadas para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi coletado. Alíquota foi utilizada para quantificação de proteína total pelo método de Bradford. Para corrida eletroforética, parte do sobrenadante foi diluída à concentração final de 1 µg/µL em tampão contendo glicerol 65% (vol/vol), 2- mercaptoetanol 2,5% (vol/vol), SDS 1,15% (peso/vol) e Tris-HCl 0,45% (pH= 6,8). Dez microlitros dos extratos diluídos, contendo 150 µg de proteína, foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-PAGE em gradiente (7-10%) com gel de empacotamento a 4% por 13 h a 275 V ⁷⁹. Posteriormente, os géis foram corados por Coomassie Blue e as isoformas das cadeias pesadas da miosina foram identificadas de acordo com a massa molecular e suas porcentagens relativas foram quantificadas por densitometria ¹⁴. Foi utilizado marcador de peso molecular Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); como padrão, foi utilizado extrato de músculo sóleo de animal controle.

Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

A análise da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina e MRF4) e do gene constitutivo β -actina foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR).

Extração de RNA com TRIzol

O fragmento muscular congelado foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido). O homogenato foi transferido para tubo de 1,5 mL e incubado por 5 min à temperatura ambiente para permitir completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após adição de 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3 min à temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e precipitada por meio de incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min, à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C. O sedimento de RNA secou por 10 min à temperatura ambiente e foi ressuspensão em solução 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 min, para inativação de possíveis resíduos de RNase. O RNA foi, então, quantificado por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e o fator de diluição do RNA (70). Foi também determinada, por espectrofotometria, a razão entre 260 e 280 nm, que fornece estimativa da qualidade do processo de extração.

Gel analítico de agarose para RNA

Para analisar a integridade do RNA, foi realizada eletroforese (1 µL da solução contendo o RNA total, 1 µL de carregador Orange e 8 µL de água ultra-pura) em gel de agarose (1%), tampão TAE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), corado com brometo de etídio, à voltagem de 80 mV.

Transcrição reversa (RT) do RNA

A RT do RNA foi realizada utilizando-se os componentes do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Mistura contendo 2 µg de RNA total, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix 100 mM, 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL) e 1 µL de RNase Inhibitor, com volume total ajustado para 20 µL de H₂O Nuclease-Free, foi incubada por 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e 5 s a 85°C. A seguir, a mistura da reação foi colocada no gelo e estocada a -80°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Alíquotas de 2,5 µL de cada amostra de cDNA foram adicionadas a mistura contendo 10 µL 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio customizado (20X) contendo primers “sense” e “anti-sense” e sonda Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específicos para cada gene. Foi adicionada água tratada com DEPC para se obter volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene alvo e para o gene constitutivo no Sistema Real Time PCR StepOne® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante: 1 ciclo a 95°C por 10 min para ativação da AmpliTaq Gold Enzyme; 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s) e anelamento-extensão (60°C por 1 min). Para cada amostra, foi plotado gráfico de amplificação mostrando um aumento do reporter dye fluorescente (Rn) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo no qual a reação atinge o limiar de detecção (critical threshold cycle - C_T), baseado na variabilidade dos dados da linha de base obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR. Os primers para os genes analisados foram obtidos através do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com). Os ensaios (primer e sonda) foram adquiridos diretamente do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e estão apresentados na tabela 1. A quantificação relativa de cada gene, normalizada pela referência endógena (β-actina), foi realizada pelo método 2^{-ΔΔCT}.

Dosagem da concentração sérica do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e da Interleucina-6 (IL-6)

A concentração sérica de TNF- α foi mensurada utilizando-se o kit ELISA TNF- α ultra-sensível para ratos (Biosource International) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, o anticorpo específico para TNF- α em ratos foi aliquotado em microplaca. As amostras (100 μ L) foram adicionadas em duplicata à placa, incubadas por 3 h e, então, lavadas. A seguir, 100 μ L de anti-TNF- α biotilado foram adicionados, incubados por 45 min e lavados. Cem microlitros de solução conjugada de estreptavidina-HRP (horseradish peroxidase) foram adicionados, novamente incubados por 45 min e lavados. Finalmente, 100 μ L de cromógeno estável foram colocados e incubados no escuro por 15 min. A reação foi interrompida com solução de interrupção ou com HCl. Após 2 h, as amostras foram analisadas a 450 nm em leitor de placa de ELISA. As curvas-padrão foram efetuadas utilizando-se solução padrão fornecida pelo fabricante. A sensibilidade do kit é de < 0,7 pg/mL e a abrangência é de 2,3 a 150 pg/mL.

A concentração sérica de IL-6 foi mensurada utilizando-se o kit ELISA IL-6 ultra-sensível para ratos (Biosource International) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 50 μ L de tampão de diluição e 50 μ L das amostras de soro foram adicionados à placa em duplicata, incubados por 2 h em temperatura ambiente e, então, lavados quatro vezes. A seguir, 100 μ L de anti-IL-6 biotilado foram adicionados, incubados por 1 h em temperatura ambiente e lavados quatro vezes. Cem microlitros de solução conjugada estreptavidina-HRP (horseradish peroxidase) foram adicionados, novamente incubados por 30 min em temperatura ambiente e lavados. Finalmente, 100 μ L de cromógeno estável foram colocados e incubados no escuro por 30 min. A reação foi interrompida com 100 μ L de solução de interrupção. As amostras foram analisadas a 450 nm em leitor de placas ELISA. A curva-padrão foi efetuada utilizando-se solução padrão fornecida pelo fabricante. A sensibilidade é de < 7 pg/mL e a abrangência de 31,2 a 2000 pg/mL.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. A comparação entre os três grupos foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. A comparação do tamanho do infarto foi realizada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Para avaliar a associação entre as variáveis, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis corporais

A presença de insuficiência cardíaca foi caracterizada no momento da eutanásia pela verificação de sinais clínico e anátomo-patológicos compatíveis com o diagnóstico de insuficiência cardíaca. No grupo IM/IC+, foi verificada a seguinte frequência desses sinais: taquipnéia em sete animais, derrame pleural e pericárdico em nove, trombos em átrio esquerdo em seis e ascite em dois; como referido anteriormente, todos os ratos tiveram hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar. Nos grupos IM/IC- e Sham nenhum rato apresentou quaisquer dos sinais de insuficiência cardíaca.

As variáveis corporais dos animais estão expostas na tabela 2. O peso corporal foi semelhante entre os três grupos de animais. O peso do VE, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, foi maior nos grupos IM quando comparados ao Sham; não houve diferença entre os grupos IM/IC- e IM/IC+. O peso do ventrículo direito e dos átrios, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, foram maiores nos grupos IM/IC- e IM/IC+ que no Sham e maior no IM/IC+ que no grupo IM/IC-. O peso do pulmão e a relação peso do pulmão/peso corporal foram maiores no grupo IM/IC+ que nos demais grupos e não diferiram entre os grupos Sham e IM/IC-.

O tamanho do infarto, avaliado em cortes histológicos, foi semelhante entre os grupos infartados (IM/IC- $39,5 \pm 6,9$ %; IM/IC+ $40,8 \pm 12,5$ %; $p= 0,79$).

Avaliação ecocardiográfica

Para certificar que os dois grupos de ratos infartados tinham disfunção ventricular no final do período experimental, foram avaliadas as estruturas cardíacas e a função do ventrículo esquerdo por ecocardiograma transtorácico. Na tabela 3 estão apresentados as variáveis estruturais avaliadas. O diâmetro diastólico do VE, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, e o diâmetro do átrio esquerdo foram maiores nos grupos IM/IC- e IM/IC+ em relação ao Sham e maiores nos ratos IM/IC+ que nos IM/IC-. O diâmetro sistólico do VE não diferiu entre os

grupos IM, porém foi maior nesses grupos que no Sham. A espessura diastólica da parede posterior do VE foi maior no grupo IM/IC+ em comparação ao grupo Sham. Os valores do diâmetro da aorta não diferiram entre os grupos. As relações diâmetro do átrio esquerdo/diâmetro da aorta e diâmetro do átrio esquerdo/peso corporal foram maiores no grupo IM/IC+ que nos outros dois grupos; estas variáveis foram estatisticamente semelhantes entre o grupo IM/IC- e o Sham.

Os resultados da avaliação funcional do VE estão expostos na tabela 4. A frequência cardíaca foi semelhante entre os três grupos. A porcentagem de encurtamento endocárdico e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE foram menores no grupos IM/IC+ e IM/IC- em relação ao Sham e menores no IM/IC+ que no IM/IC-. A onda E mitral e a relação E/A foram maiores no grupo IM/IC+ quando comparado aos outros dois grupos, os quais apresentaram comportamento semelhante para estas variáveis. Os valores da onda A mitral foram menores no grupo IM/IC+ que nos outros grupos e não diferiram entre Sham e IM/IC-. O tempo de desaceleração da onda E mitral foi menor no grupo IM/IC+ quando comparado ao outros dois grupos e foi maior no grupo IM/IC- em relação ao Sham. O tempo de relaxamento isovolumétrico do VE não diferiu entre os três grupos.

Análise morfológica e histoquímica do músculo diafragma

A avaliação da morfologia geral do músculo diafragma foi realizada em lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (figura 1). Nos três grupos, as fibras musculares apresentaram morfologia normal. As áreas seccionais das fibras musculares não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Sham 1.354 ± 170 ; IM/IC- 1.522 ± 397 ; IM/IC+ $1.477 \pm 241 \mu\text{m}^2$; $p = 0,53$; figura 2). A diferenciação das fibras de acordo com a atividade metabólica foi realizada em lâminas coradas pela reação histoquímica de NADH-TR (figura 3). Não verificamos diferença entre os grupos para as áreas das fibras oxidativas ou glicolíticas (fibras oxidativas: Sham 1.032 ± 158 , IM/IC- 1.005 ± 72 , IM/IC+ $1.030 \pm 180 \mu\text{m}^2$; $p = 0,958$; fibras glicolíticas: Sham 2.859 ± 524 ; IM/IC- 3.173 ± 631 ; IM/IC+ $2.786 \pm 547 \mu\text{m}^2$; $p = 0,482$; figura 4).

Avaliação por eletroforese das isoformas das cadeias pesadas da miosina

Foram detectadas quatro isoformas de cadeias pesadas de miosina no músculo diafragma: I, Iib, IId e IIa. A porcentagem da isoforma I, em relação ao total das cadeias pesadas de miosina, foi maior no grupo IM/IC+ em comparação ao IM/IC-; não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos infartados e o Sham (Sham $24,2 \pm 6,8$; IM/IC- $22,9 \pm 2,6$; IM/IC+ $33,1 \pm 11,2$ %; $p=0,04$). A porcentagem da isoforma Iib foi menor no grupo IM/IC+ quando comparado ao Sham; o grupo IM/IC- não diferiu dos demais grupos (Sham $22,9 \pm 8,3$; IM/IC- $20,9 \pm 9,9$; IM/IC+ $11,5 \pm 6,4$ %; $p=0,03$). A porcentagem da isoforma IIa foi semelhante entre os grupos (Sham $36,7 \pm 8,3$; IM/IC- $34,1 \pm 10,7$; IM/IC+ $40,7 \pm 6,7$ %; $p=0,34$). Houve tendência para a porcentagem da isoforma IId ser maior no grupo IM/IC- (Sham $13,3 \pm 7,2$; IM/IC- $22,2 \pm 7,1$; IM/IC+ $14,6 \pm 7,3$ %; $p=0,074$; figura 5). Para avaliar se a composição das isoformas das MyHCs está relacionada à gravidade da insuficiência cardíaca, calculamos a correlação de Pearson entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal e as diferentes isoformas das MyHCs. O diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal foi diretamente correlacionado com a porcentagem de isoforma I ($p= 0,005$) e inversamente correlacionado com a porcentagem de isoforma Iib ($p= 0,02$) das MyHCs (figura 6).

Análise dos expressão gênica dos fatores de regulação miogênica por RT-PCR em tempo real

A expressão gênica dos fatores de regulação miogênica miogenina (Sham $1,00 \pm 0,35$; IM/IC- $1,14 \pm 0,81$; IM/IC+ $1,50 \pm 1,12$ unidades arbitrárias; $p= 0,423$; figura 7), MyoD (Sham $1,00 \pm 0,57$; IM/IC- $1,11 \pm 1,07$; IM/IC+ $0,71 \pm 0,45$ unidades arbitrárias; $p= 0,492$; figura 8) e MRF4 (Sham $1,00 \pm 0,33$; IM/IC- $1,37 \pm 0,84$; IM/IC+ $1,00 \pm 0,57$ unidades arbitrárias; $p= 0,335$; figura 9) foi semelhante entre os três grupos experimentais.

Concentração sérica de citocinas

A concentração sérica de TNF- α (Sham $1,22 \pm 0,35$; IM/IC- $1,99 \pm 0,74$; IM/IC+ $2,07 \pm 1,06$ pg/mL; $p= 0,019$; figura 10) e IL-6 (Sham $16,50 \pm 8,83$; IM/IC- $25,14 \pm 13,56$; IM/IC+ $43,15 \pm 9,42$ pg/mL; $p= 0,02$; figura 12) foi maior nos animais do grupo IM/IC+ quando comparado ao grupo Sham. Não houve diferença significativa entre IM/IC- e os outros grupos. A concentração sérica de TNF- α foi diretamente correlacionada com a porcentagem de isoforma I das cadeias pesadas de miosina ($p= 0,03$; figura 11).

Tabela 1. Genes analisados por RT-PCR em tempo real

Genes	Nº. Acesso	Ensaio
MyoD	NM_176079	Rn00598571_m1
Miogenina	NM_017115	Rn00567418_m1
MRF4	NM_013172	Rn00565920_m1
β-actina	NM_031144.2	Rn00667869_m1

Nº Acesso: número de acesso às seqüências publicadas no GenBank

Ensaio: código do ensaio pré-otimizado pela *Applied Biosystems*

Tabela 2. Variáveis anatômicas dos animais

Variáveis	Sham (n=10)	IM/IC- (n=10)	IM/IC+ (n=10)	Valor de p
PC (g)	461 ± 40	495 ± 38	463 ± 36	0,092
VE (g)	0,764 ± 0,072	0,897 ± 0,090*	0,881 ± 0,080*	<0,001
VD (g)	0,202 ± 0,015	0,248 ± 0,030*	0,483 ± 0,054*#	<0,001
Átrios (g)	0,090 ± 0,016	0,131 ± 0,026*	0,288 ± 0,055*#	<0,001
VE/PC (mg/g)	1,723 ± 0,012	1,830 ± 0,136*	1,856 ± 0,174*	<0,001
VD/PC (mg/g)	0,441 ± 0,039	0,501 ± 0,055*	1,045 ± 0,109*#	<0,001
Átrios/PC (mg/g)	0,197 ± 0,040	0,266 ± 0,052*	0,625 ± 0,132*#	<0,001
Pulmão (g)	1,879 ± 0,251	1,968 ± 0,190	3,464 ± 0,364*#	<0,001
Pulmão/PC (mg/g)	4,082 ± 0,447	3,979 ± 0,286	7,528 ± 1,041*#	<0,001

IM/IC-: grupo infarto do miocárdio sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo infarto do miocárdio com insuficiência cardíaca; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão; *: estatisticamente diferente do grupo Sham; #: estatisticamente diferente do grupo IM/IC-; ANOVA e Tukey.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica das variáveis estruturais do coração

Variáveis	Sham (n=10)	IM/IC- (n=10)	IM/IC+ (n=10)	Valor de p
DDVE (mm)	8,44 ± 0,41	10,88 ± 0,99*	12,02 ± 0,53*#	< 0,001
DDVE/PC (mm/kg)	17,71 ± 1,22	21,02 ± 1,813*	25,51 ± 1,96*#	< 0,001
DSVE (mm)	4,41 ± 0,32	8,48 ± 1,32*	10,1 ± 0,51*	< 0,001
EDPP (mm)	1,47 ± 0,07	1,58 ± 0,13	1,73 ± 0,19*	< 0,001
AO (mm)	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	0,131
AE (mm)	6,0 ± 0,4	6,7 ± 0,7*	8,8 ± 0,9*#	< 0,001
AE/AO	1,45 ± 0,10	1,72 ± 0,21	2,20 ± 0,22*#	< 0,001
AE/PC (mm/kg)	12,47 ± 0,92	13,11 ± 1,53	18,68 ± 2,10*#	< 0,001

IM/IC-: grupo infarto do miocárdio sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo infarto do miocárdio com insuficiência cardíaca; n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PC: peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão; *: estatisticamente diferente do grupo Sham; #: estatisticamente diferente do grupo IM/IC-; ANOVA e Tukey.

Tabela 4. Avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	Sham (n=10)	IM/IC- (n=10)	IM/IC+ (n=10)	Valor de p
FC (bpm)	279 ± 10	274 ± 39	260 ± 32	0,348
ΔD (%)	47,8 ± 2,5	22,4 ± 6,6*	16,3 ± 3,5*#	< 0,001
VEPP (mm/s)	37,8 ± 2,5	28,3 ± 6,6*	22,1 ± 3,5*#	< 0,001
Onda E	66,9 ± 3,9	66,1 ± 9,7	89,5 ± 15,1*#	< 0,001
Onda A	42,8 ± 7,2	49,3 ± 12,8	23,4 ± 18,1*#	< 0,001
E/A	1,60 ± 0,26	1,42 ± 0,37	4,96 ± 1,90*#	0,002
TDE (ms)	45,3 ± 4,4	52,0 ± 6,7*	32,7 ± 5,5*#	< 0,001
TRIV (ms)	28,2 ± 4,5	33,9 ± 3,5	29,7 ± 7,3	0,063

IM/IC-: grupo infarto do miocárdio sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo infarto do miocárdio com insuficiência cardíaca; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; ΔD: encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão; *: estatisticamente diferente do grupo Sham; #: estatisticamente diferente do grupo IM/IC-; ANOVA e Tukey.

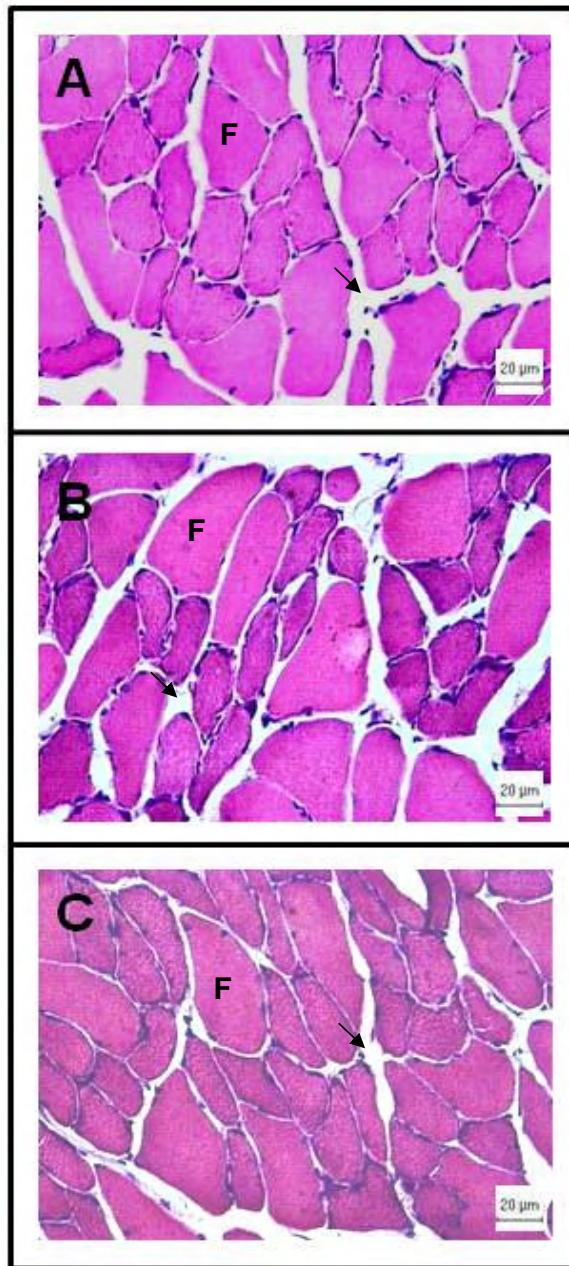


Figura 1. Fotomicrografia de lâminas histológicas do músculo diafragma coradas por hematoxilina-eosina. A: Grupo Sham; B: Grupo IM/IC- (grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca); C: Grupo IM/IC+ (grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca); F: fibra muscular; setas indicam matriz extracelular.

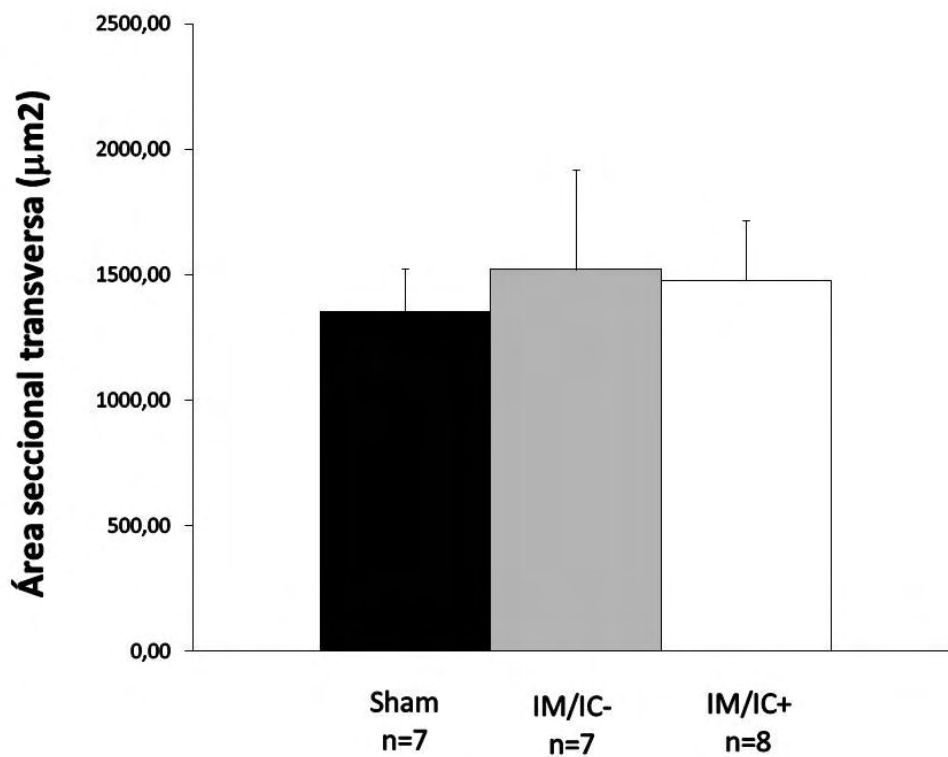


Figura 2. Análise morfométrica do músculo diafragma. IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA.

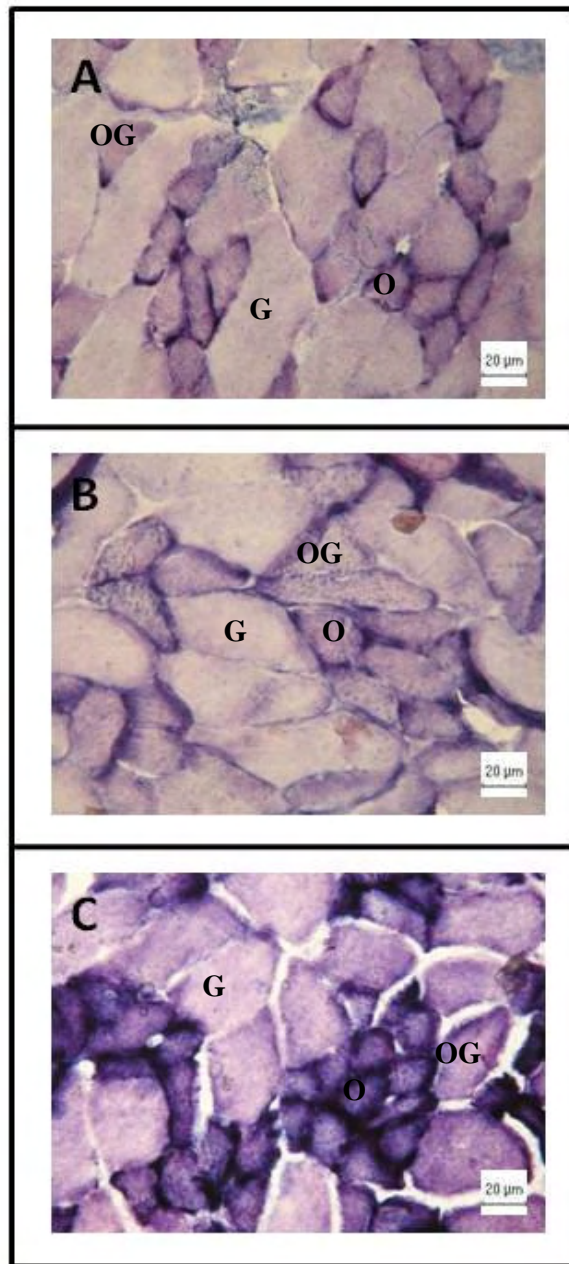


Figura 3. Fotomicrografia do músculo diafragma submetidos à reação de NADH-TR. As fibras musculares foram classificadas em oxidativas (O), glicolíticas (G) e oxidativas/glicolíticas (OG). A: Grupo Sham; B: Grupo IM/IC- (grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca); C: Grupo IM/IC+ (grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca).

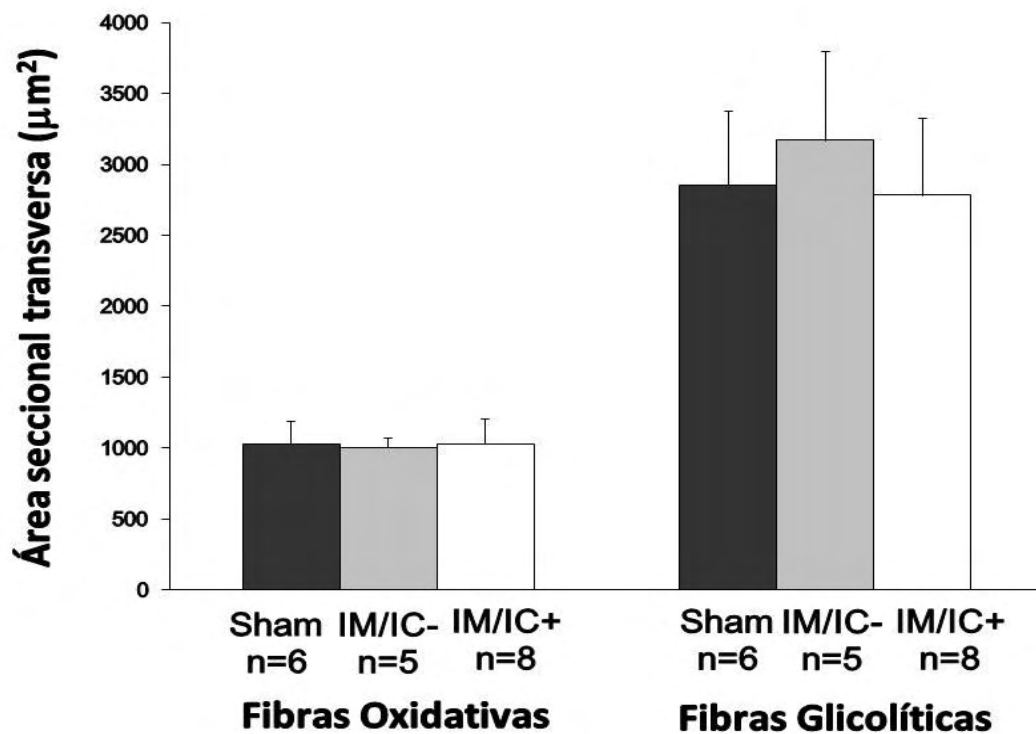


Figura 4. Análise morfométrica do músculo diafragma submetidos à reação de NADH-TR; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA.

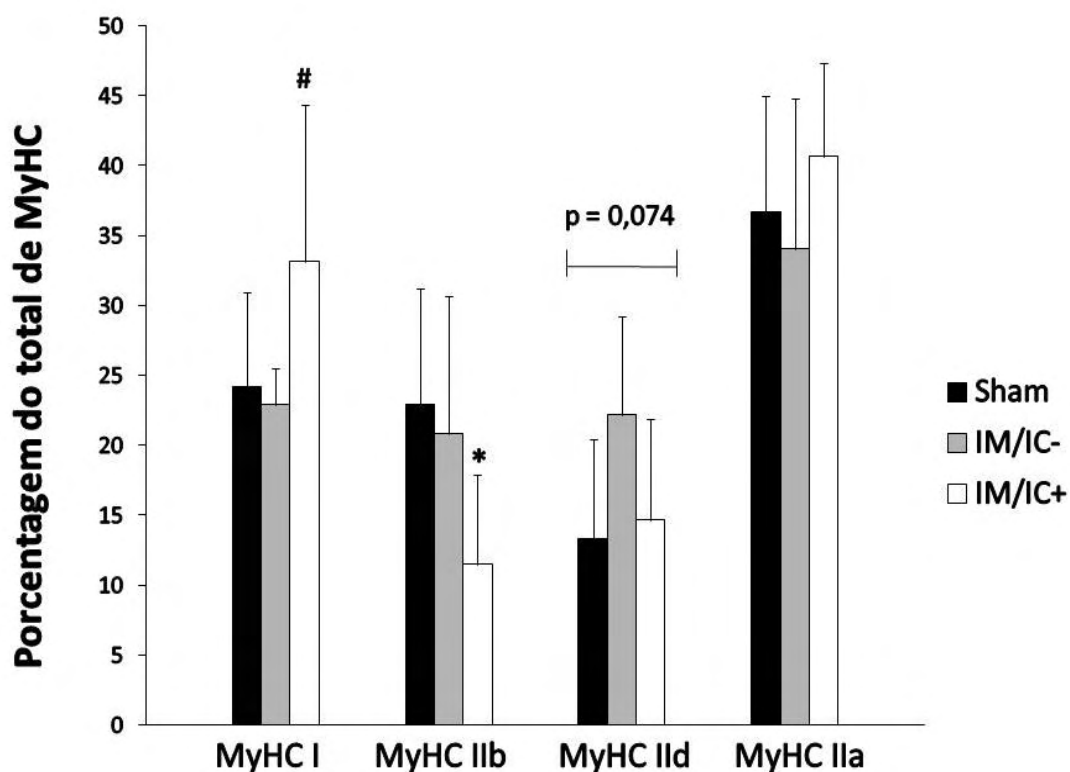


Figura 5. Distribuição das isoformas das cadeias pesadas de miosina (MyHC) no músculo diafragma analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A quantidade de cada isoforma de MyHC está expressa em relação à quantidade total de MyHC; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em média \pm desvio padrão; *: $p < 0,05$ vs. Sham; #: $p < 0,05$ vs. IM/IC-; ANOVA e Tukey.

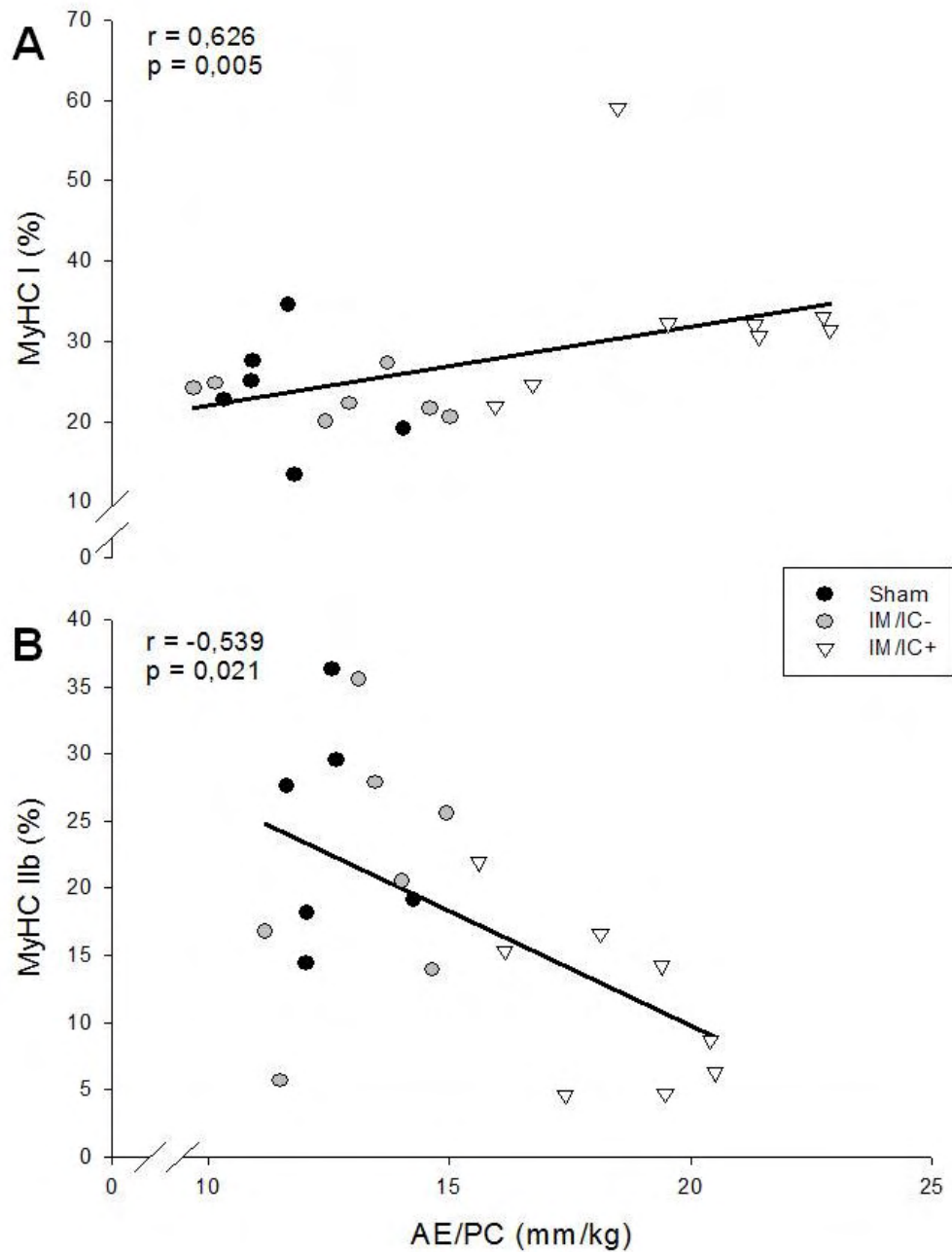


Figura 6. Diagrama de dispersão entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC) e as porcentagens das isoformas da cadeia pesada da miosina Ib (MyHC Ib), em A, e Iib (MyHC Iib), em B; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; correlação de Pearson.

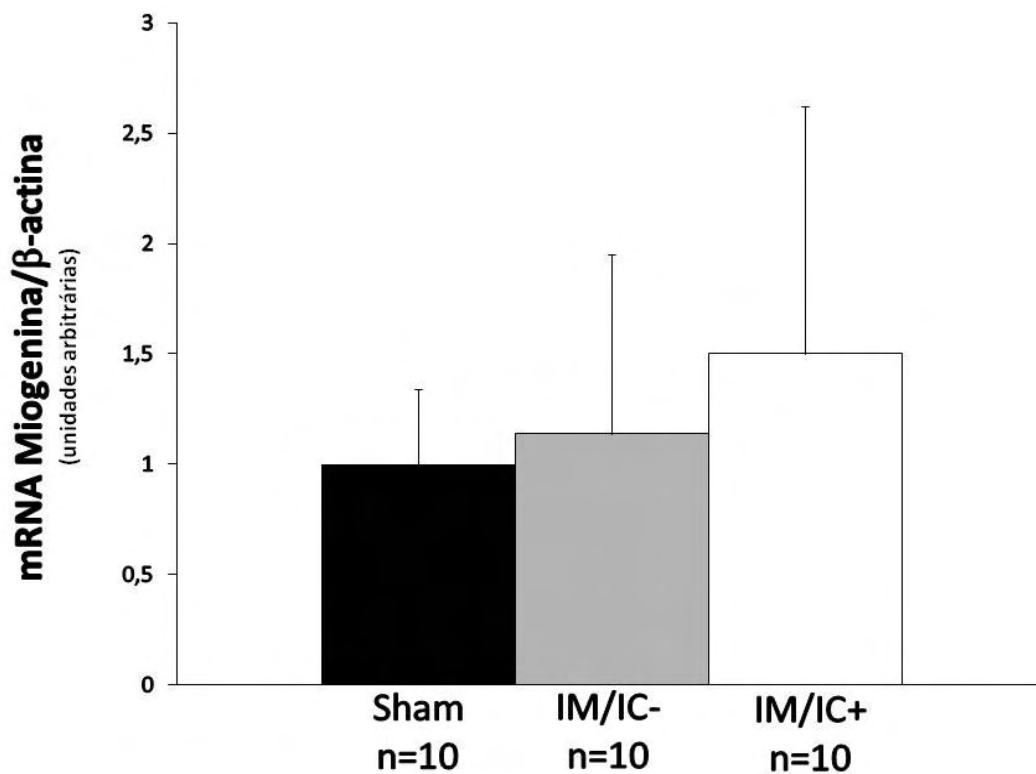


Figura 7. Expressão gênica do fator de regulação miogênica miogenina, avaliada por RT-PCR em tempo real; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em unidades arbitrárias; média \pm desvio padrão; ANOVA.

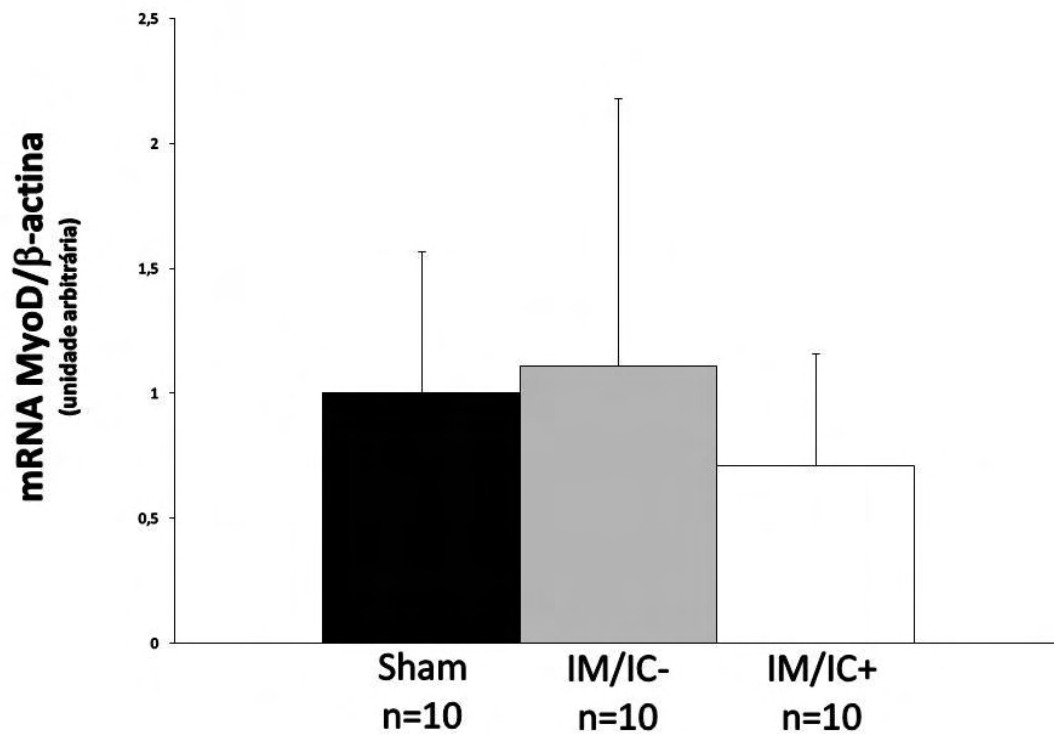


Figura 8. Expressão gênica do fator de regulação miogênica MyoD, avaliada por RT-PCR em tempo real; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em unidades arbitrárias; média \pm desvio padrão; ANOVA.

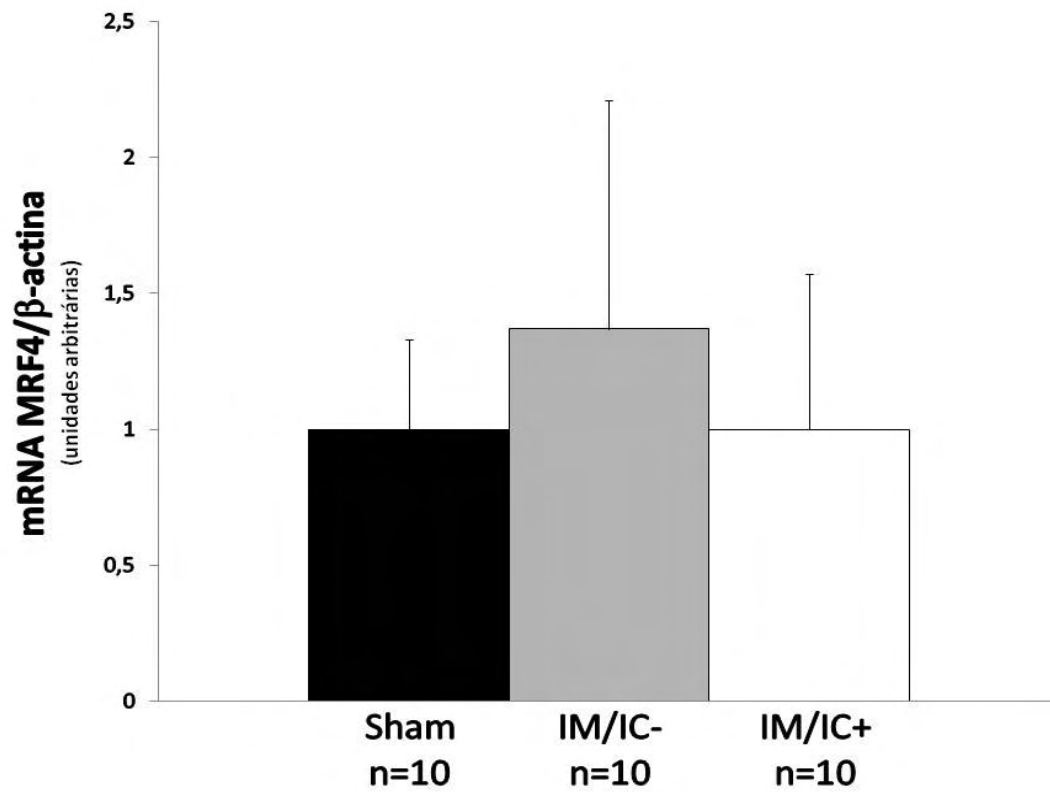


Figura 9. Expressão gênica do fator de regulação miogênica MRF4 por RT-PCR em tempo real; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em unidades arbitrárias; média ± desvio padrão; ANOVA.

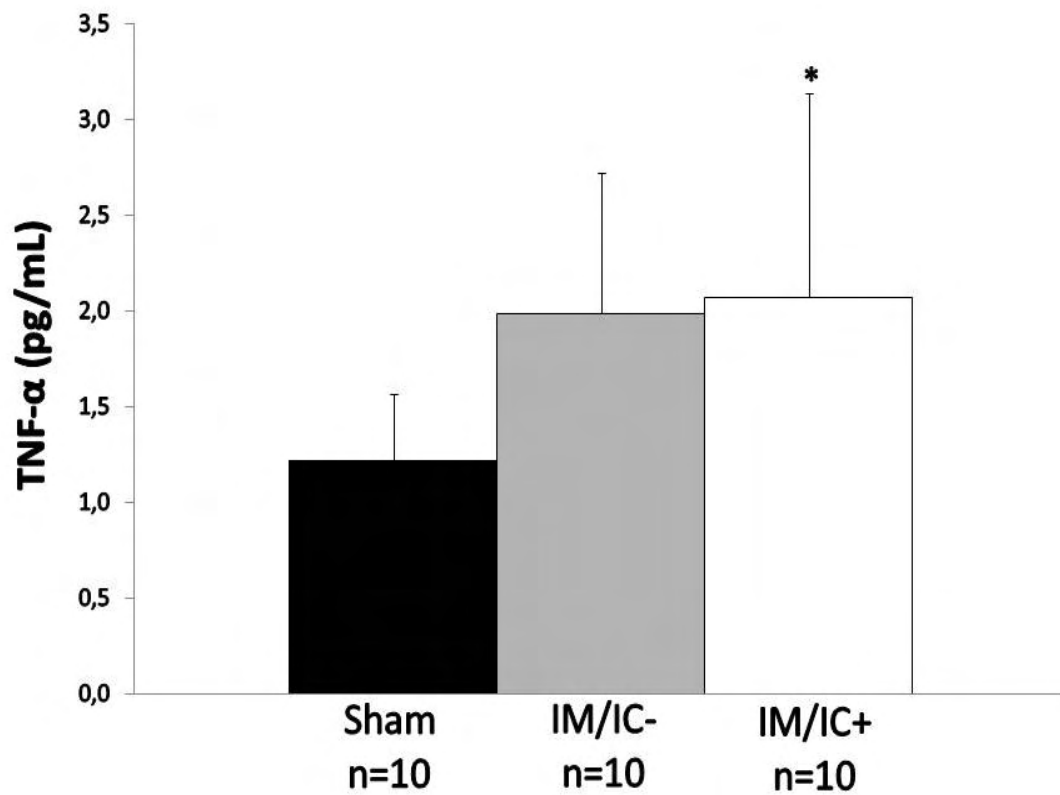


Figura 10. Concentração sérica de TNF- α , mensurada por ELISA; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em média \pm desvio padrão; *: $p < 0,05$ vs. Sham; ANOVA e Tukey.

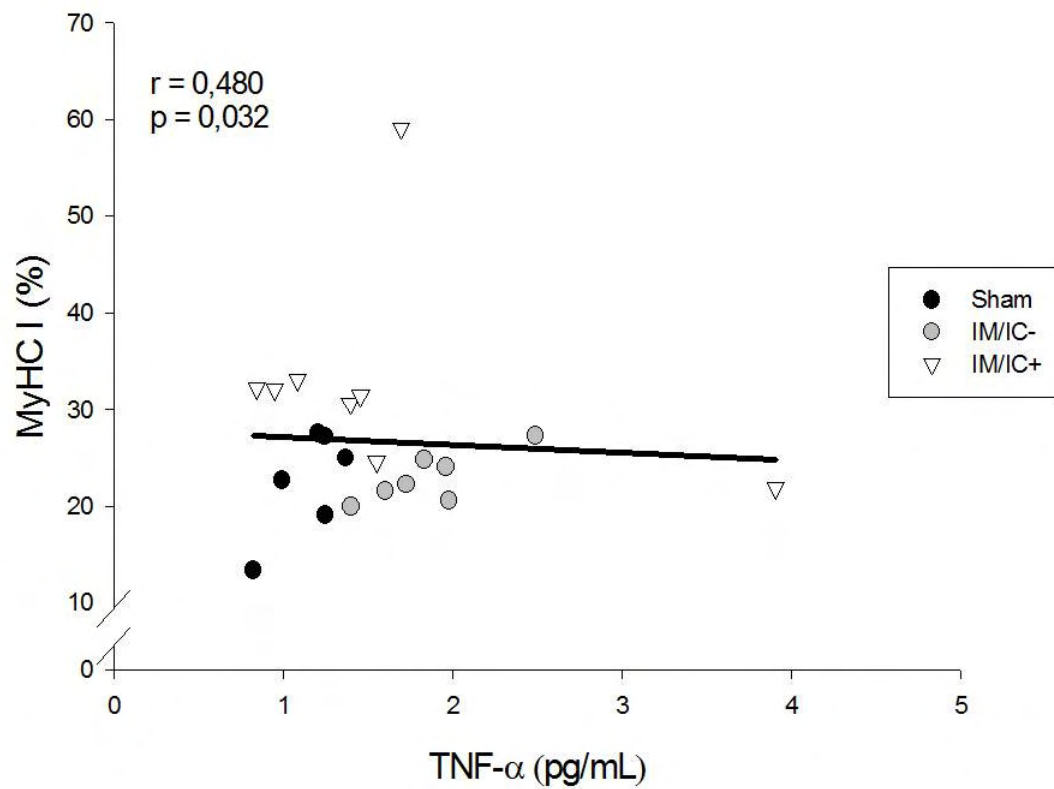


Figura 11. Diagrama de dispersão entre a concentração sérica de TNF- α e a porcentagem da isoforma da cadeia pesada da miosina I (MyHC I); IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; correlação de Pearson.

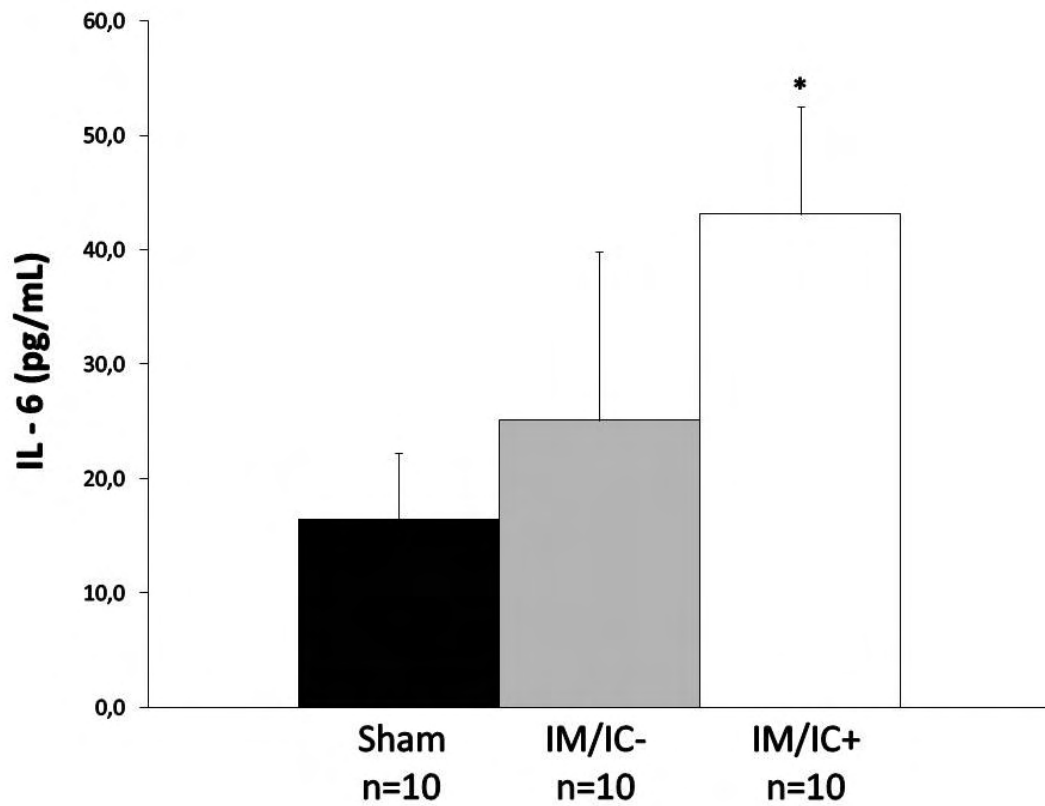


Figura 12. Concentração sérica de IL-6, mensurada por ELISA; IM/IC-: grupo de animais infartados sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: grupo de animais infartados com insuficiência cardíaca; dados expressos em média \pm desvio padrão; *: $p < 0,05$ vs. Sham; ANOVA e Tukey.

Discussão

Neste estudo avaliamos, pela primeira vez na literatura, a expressão gênica dos fatores de regulação mio gênica, a composição das cadeias pesadas de miosina e o trofismo do músculo diafragma de ratos infartados nas fases de disfunção ventricular esquerda e de insuficiência cardíaca.

A insuficiência cardíaca foi induzida por infarto do miocárdio decorrente de ligadura da artéria coronária esquerda. O modelo experimental de infarto é muito utilizado porque é prático, de baixo custo, mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subsequentes^{80,81}. Além disso, cursa com desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, de modo semelhante ao que comumente se observa em casos de insuficiência cardíaca em humanos.

O diagnóstico de insuficiência cardíaca foi realizado pela observação de sinais clínicos e anátomo-patológicos avaliados *in vivo*, taquipnéia, e *post mortem*, ascite, derrame pleuropericárdico, trombos em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar. De acordo com estudos realizados em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca, a hipertrofia do ventrículo direito, definida como a relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/g, é a melhor variável para selecionar animais com insuficiência cardíaca⁸²⁻⁸⁴. Considera-se que a hipertrofia ventricular direita é decorrente de hipertensão pulmonar resultante de aumento da pressão de enchimento do átrio esquerdo⁸³. Mais recentemente, foi observado que o peso dos pulmões, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, também constitui bom índice preditor de insuficiência cardíaca em ratos.⁶³. Utilizando esse índice, considera-se que ratos encontram-se em insuficiência cardíaca quando o peso dos pulmões é maior que a soma da média e dois desvios padrão dos valores obtidos no grupo controle⁶³. Em nosso estudo, todos os animais do grupo IM/IC+ tiveram hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar. Outros achados anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca tiveram frequência variável no grupo IM/IC+ entre 20 e 90 %. O tamanho do infarto normalmente é tido como preditor de insuficiência cardíaca. Entretanto, em ratos, este fator, isoladamente, não é determinante para o aparecimento da

síndrome ⁸⁵. Em nosso estudo, ambos os grupos infartados apresentaram tamanho de infarto semelhante.

Para caracterizar a disfunção ventricular no grupo sem insuficiência cardíaca, foram avaliadas a estrutura cardíaca e a função ventricular por ecocardiograma transtorácico. Os resultados mostraram que o grupo IM/IC- apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhadas de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparado ao grupo Sham. O comprometimento do coração causado pelo infarto do miocárdio foi maior no grupo IM/IC+ que no IM/IC-. Este fato pode ser evidenciado pela maior dilatação das câmaras esquerdas no grupo IM/IC+ que no IM/IC-, como o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, e o diâmetro do átrio esquerdo, isolado ou normalizado pelo diâmetro da aorta ou peso corporal. Similarmente, os índices de função sistólica porcentagem de encurtamento endocárdico e velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo foram menores em ambos os grupos infartados e menores ainda no grupo com insuficiência cardíaca. Também os índices de função diastólica apresentaram-se mais alterados no grupo IM/IC+ que no grupo IM/IC-. É importante ressaltar que o aumento significativo da relação E/A e a redução do tempo de desaceleração da onda E mitral indicam grau mais grave de disfunção diastólica no grupo IM/IC+.

A relação entre o diâmetro do átrio esquerdo e o peso corporal (AE/PC) é facilmente mensurável em ratos infartados e é considerada um bom índice para avaliar as propriedades sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo ⁸⁵. Em ratos com infarto do miocárdio, a dilatação do átrio esquerdo foi altamente correlacionada com a velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo e com a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo ⁸⁵. Assim, neste estudo, a relação AE/PC foi utilizada como marcador de gravidade da disfunção ventricular para correlações com as isoformas das cadeias pesadas de miosina.

O músculo diafragma foi selecionado como representante da musculatura respiratória porque é o mais importante músculo inspiratório nos mamíferos e um dos músculos respiratórios mais acometidos na insuficiência cardíaca ^{41,42}. Neste estudo, não observamos alterações morfológicas das fibras musculares do diafragma sob microscopia óptica. Da mesma forma, não observamos

alteração do trofismo do diafragma entre os três grupos. A reação histoquímica de NADH-TR permitiu analisar a área seccional das fibras de acordo com o tipo de metabolismo, se preferencialmente oxidativo ou glicolítico. O trofismo muscular foi semelhante entre os grupos tanto para as fibras oxidativas como para as glicolíticas. Nossos dados são concordantes com os de Lopes et al. ⁴⁵, que avaliaram o músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina. Também em humanos com insuficiência cardíaca grave, cuja biopsia diafragmática foi obtida durante cirurgia para transplante cardíaco, não foi observada atrofia das fibras musculares, quando comparado com pacientes submetidos a toracotomia para revascularização miocárdica ou ablação de vias elétricas ⁴¹. Por outro lado, atrofia das fibras diafragmáticas foi observada em ratos com insuficiência cardíaca aguda induzida por interleucina-6 ⁶ e em porcos Yucatan com insuficiência cardíaca induzida por taquicardia supraventricular ³⁵. Estudos experimentais sugerem que a ativação de citocinas pró-inflamatórias na insuficiência cardíaca tais como o TNF- α pode levar a atrofia de músculos esqueléticos por meio de ativação da via NF- κ B ^{53,54}. Entretanto, durante a insuficiência cardíaca, o músculo diafragma habitualmente opera em situação de aumento de carga de trabalho, uma vez que suas fibras se contraem para expandir pulmões congestos. Assim, é provável que a ação destas duas forças antagônicas tenha contribuído para a preservação do trofismo muscular neste estudo.

Neste trabalho, observamos que o grupo IM/IC+ apresentou aumento da porcentagem da isoforma I em relação ao grupo IM/IC- e redução na proporção da isoforma IIb das cadeias pesadas de miosina quando comparado ao Sham. Alterações da composição das cadeias pesadas de miosina durante a insuficiência cardíaca têm sido frequentemente encontradas em estudos clínicos ^{44,86} e experimentais ^{42,45,87}. Acredita-se que modificações das isoformas das cadeias pesadas de miosina contribuam para a disfunção diafragmática frequentemente observada na insuficiência cardíaca ^{35,88}. A alteração na composição das cadeias pesadas das MyHCs observada neste estudo está de acordo com aquelas relatadas por outros autores em diferentes modelos experimentais de insuficiência cardíaca ^{35,42,44,45}. Como referido anteriormente, a composição das MyHCs do músculo diafragma altera-se em sentido inverso àquele habitualmente encontrado na musculatura periférica ^{14,22,29,89,90}. Tem

sido sugerido que a alteração das fibras do diafragma para fenótipo mais lento é devida à sobrecarga de trabalho a que este músculo está submetido na insuficiência cardíaca ^{35,41,44}. O grupo IM/IC- apresentou padrão de composição das MyHCs estatisticamente semelhante tanto ao grupo Sham como ao IM/IC+. Entretanto, foi interessante observar que a isoforma I das MyHCs correlacionou-se positivamente e a isoforma IIB negativamente com a variável AE/PC, sugerindo que as alterações das MyHCs podem estar relacionadas ao grau de disfunção ventricular. Estes dados estão de acordo com os resultados de Spangenburg et al. ⁹¹ sugerindo que a alteração das MyHCs é diretamente proporcional à gravidade da insuficiência cardíaca.

Apesar de existirem fortes evidências de alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca ^{16,45,92}, nossa hipótese de que a expressão gênica dos fatores de regulação miogênica pudesse modular a composição das isoformas das cadeias pesadas de miosina no diafragma de ratos com insuficiência cardíaca crônica não se confirmou.

A miogenina encontra-se frequentemente associada à expressão de enzimas oxidativas e parece ter papel fundamental na caracterização do metabolismo muscular ^{43,47,93,94}. Além disso, está envolvida no processo de ativação de células satélites e formação de miotubos ⁹⁵. Neste trabalho, apesar da mudança do músculo diafragma para padrão mais lento, não observamos alteração da expressão gênica da miogenina. Por outro lado, Martinez et al. ⁹² observaram, no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca, atrofia e redução da expressão protéica da miogenina na ausência de alterações da composição das MyHCs. No presente estudo, como não avaliamos a expressão protéica da miogenina, não podemos descartar sua participação nas alterações da composição das MyHCs.

O MRF4 é predominantemente expresso em fibras lentas, oxidativas, e parece desempenhar papel importante na regulação do trofismo muscular ⁹⁶. Em estudos experimentais, a redução da expressão de mRNA para MRF4 foi associada a atrofia da musculatura esquelética ^{16,97}. Em nosso estudo, o músculo diafragma apresentou trofismo preservado e expressão gênica inalterada para o MRF4.

Situações em que há proliferação de células satélites são, habitualmente, caracterizadas por aumento da expressão da MyoD ^{49,51,98}. Em animais adultos, a ativação de células satélites geralmente está associada à ocorrência de lesão e

regeneração muscular⁹⁹. Assim, a ausência de alterações morfológicas no diafragma poderia justificar a preservação da expressão gênica de MyoD nos ratos infartados. Entretanto, como já referido, o aumento da concentração sérica de TNF- α pode levar a diminuição da expressão da MyoD por meio de ativação da via NF- κ B e degradação da proteína I κ B^{53,54,100-102}. De fato, Carvalho et al.¹⁶ observaram redução da expressão gênica da MyoD nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos de ratos com insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina. Neste mesmo modelo experimental, o mRNA para a MyoD foi também reduzido no músculo diafragma⁴⁵. Além disso, a MyoD está relacionada à expressão das isoformas rápidas das MyHCs^{47,48,51,103}. Assim, neste estudo, como a concentração sérica de TNF- α foi aumentada e as isoformas rápidas das MyHCs diminuídas no grupo IM/IC+, esperávamos redução da expressão da MyoD nestes animais. É importante salientar que alterações pós-translacionais dos fatores de regulação miogênica podem estar presentes na insuficiência cardíaca e terem papel na alteração da composição das MyHCs. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a expressão protéica dos fatores de regulação miogênica no diafragma durante a insuficiência cardíaca.

Em nosso estudo, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram concentrações séricas significativamente elevadas de TNF- α e interleucina-6 em relação ao grupo Sham. O grupo IM/IC- apresentou valores intermediários para estas variáveis e não diferiu estatisticamente dos grupos IM/IC+ e Sham. O aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes na insuficiência cardíaca foi bem demonstrado no trabalho pioneiro de Levine et al.⁵² e posteriormente confirmado em estudos clínicos^{28,104} e experimentais^{6,105}. No presente estudo mostramos, pela primeira vez, que a concentração sérica de TNF- α está relacionada com a composição das MyHCs do músculo diafragma na insuficiência cardíaca. A porcentagem da isoforma I foi diretamente correlacionada com a concentração sérica de TNF- α . Embora não tenhamos identificado estudos avaliando a relação entre TNF- α e MyHCs na insuficiência cardíaca, trabalhos em outros modelos experimentais sugerem o potencial papel do TNF- α em modular a composição das MyHCs no diafragma. Por exemplo, o aumento da concentração sérica de TNF- α , por manipulação gênica¹⁰¹ ou administração exógena^{106,107}, reduz a síntese de proteínas miofibrilares¹⁰⁶ e a geração de força pelo diafragma^{101,107}. Além disso, a deleção do TNF- α em

camundongos com distrofia muscular promove alteração no perfil das MyHCs e aumento na força de contração do diafragma ¹⁰⁸. Finalmente, terapia com laser pode diminuir a concentração de TNF- α e melhorar a força contrátil do diafragma ¹⁰². Em relação à interleucina-6, não está definido se esta citocina está envolvida nas alterações da musculatura ou se seu aumento reflete apenas um epifenômeno na síndrome da insuficiência cardíaca.

Em conclusão, a expressão gênica dos fatores de regulação miogênica não parece modular a composição das cadeias pesadas de miosina do músculo diafragma na insuficiência cardíaca crônica induzida por infarto do miocárdio. As alterações das isoformas das cadeias pesadas de miosina do músculo diafragma são relacionadas ao grau de disfunção ventricular e à concentração sérica de TNF- α .

Referências Bibliográficas

1. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1938-1947.
2. Florea VG, Mareyev VY, Achilov AA, Popovici MI, Coats AJS, Belenkov YN. Central and peripheral components of chronic heart failure: determinants of exercise tolerance. *Int J Cardiol.* 1999;70:51-56.
3. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation.* 1993;87:470-475.
4. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85:1364-1373.
5. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation.* 1991;84:1597-1607.
6. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation.* 2005;111:996-1005.
7. Dayer MJ, Hopkinson NS, Ross ET, Jonville S, Sharshar T, Kearney M, Moxham J, Polkey MI. Does symptom-limited cycle exercise cause low frequency diaphragm fatigue in patients with heart failure? *Eur J Heart Fail.* 2006;8:68-73.
8. Harrington D, Anker SD, Coats AJS. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J.* 2001;22:392-399.
9. Coats AJ. Origin of symptoms in patients with cachexia with special reference to weakness and shortness of breath. *Int J Cardiol.* 2002;85:133-139.
10. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest.* 1999;115:836-847.
11. Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations

- after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1995;269:1507-1513.
12. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path.* 2010;91:54-62.
 13. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure induces atrophy and myogenin downregulation in rat skeletal muscle. *Eur Heart J.* 2009;30:289-290.
 14. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path.* 2003;84:201-206.
 15. Carvalho RF, Dariolli R, L.A. JJ, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:437-443.
 16. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path.* 2006;87:219-225.
 17. Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol.* 1969;42:1-29.
 18. Hilber K, Galler S, Gohlsch B, Pette D. Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1999;455:267-270.
 19. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry.* 1989;92:453-457.
 20. Ashmore CR, Doerr L. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp Neurol.* 1991;31:408-418.

21. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990;81:518-527.
22. Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J, Massie BM. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res*. 1996;79:128-136.
23. Robbins N, Fahim MA. Progression of age changes in mature mouse motor nerve terminals and its relation to locomotor activity. *J Neurocytol*. 1985;14:1019-1036.
24. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1983;54:80-93.
25. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2003;146:156-216.
26. Sandri M, Podhorska-Okolow M, Geromel V, Rizza C, Arslan P, Monti D, Franceschi C, Carraro U. Exercise induces myonuclear ubiquitination and apoptosis in dystrophin-deficient muscle of mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56.
27. Vescovo G, Serafini F, Facchin L, Tenderini P, Carraro U, Dalla Libera L, Catani C, Ambrosio GB. Specific changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition in cardiac failure: differences compared with disuse atrophy as assessed on microbiopsies by high resolution electrophoresis. *Heart*. 1996;76:337-343.
28. Vescovo G, Volterrani M, Zennaro R, Sandri M, Ceconi C, Lorusso R, Ferrari R, Ambrosio GB, Dalla Libera L. Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart*. 2000;84:431-437.
29. Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, Dalla Libera L. 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.* 1998;39:233-241.
30. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G, Ambrosio GB, Vescovo G. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation.* 2001;103:2195-2200.
 31. Aubier M. Alteration in diaphragmatic function during cardiac insufficiency: potential pharmacology modulation. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2293-2302.
 32. MacFarlane NG, Darnley GM, Smith GL. Cellular basis for contractile dysfunction in the diaphragm from a rabbit infarct model of heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C739-C746.
 33. Carmo MM, Bárbara C, Ferreira T, Branco J, Ferreira S, Rendas AB. Diaphragmatic function in patients with chronic left ventricular failure. *Pathophysiology.* 2001;8:55-60.
 34. Dempsey JA, Romer L, Miller J, Smith C. Consequences of exercise-induced respiratory muscle work. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2006;151:242-250.
 35. Howell S, Maarek JMI, Fournier M, Sullivan K, Zhan WZ, Sieck GC. Congestive heart failure: differential adaptation of the diaphragm and latissimus dorsi. *J Appl Physiol.* 1995;79:389-397.
 36. Barr DJ, Green HJ, Lounsbury DS, Rush JWE, Ouyang J. Na⁺-K⁺-ATPase properties in rat heart and skeletal muscle 3 months after coronary artery ligation. *J Appl Physiol.* 2005;99:656-664.
 37. Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecarpentier Y. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1009-H1017.
 38. van Hees HWH, van der Heijden HFM, Ottenheijm CA, Heunks LMA, Pigmans CJ, Verheugt FWA, Brouwer RM, Dekhuijzen PNR. Diaphragm single-fiber weakness and loss of myosin in congestive heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H819-H828.

39. Supinski GS, Callahan LA. Diaphragmatic free radical generation increases in an animal model of heart failure. *J Appl Physiol*. 2005;99:1078-1084.
40. Dall'Ago P, Chiappa GRS, Guths H, Stein R, Ribeiro JP. Inspiratory muscle training in patients with heart failure and inspiratory muscle weakness. A randomized trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:757-763.
41. Lindsay DC, Lovegrove CA, Dunn MJ, Bennett JG, Pepper JR, Yacoub MH, Poole-Wilson PA. Histological abnormalities of muscle from limb, thorax and diaphragm in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1996;17:1239-1250.
42. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Serrurier B, Ventura-Clapier R. Dual influence of disease and increased load on diaphragm muscle in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:699-710.
43. Coirault C, Langeron O, Lambert F, Blanc F, Lerebours G, Claude N, Riou B, Chemla D, Lecarpentier Y. 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*. 1999;291:70-75.
44. Tikunov BA, Mancini D, Levine S. Changes in myofibrillar protein composition of human diaphragm elicited by congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:2537-2541.
45. Lopes FS, Carvalho RF, Campos GER, Sugizaki MM, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC, Dal Pai-Silva M. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Path*. 2008;89:216-222.
46. Martinez PF, Okoshi K, Carvalho RF, Campos DHS, Damatto RL, Lima ARR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2007;5:203-210.
47. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 1993;118:1137-1147.

48. Hughes SM, Koyschi K, Rudnicki M, Maggs AM. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev.* 1997;61:151-163.
49. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:723-732.
50. Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989;58:537-544.
51. Seward DJ, Haney JC, Rudnick MA, Swoap SJ. bHLH transcription factor MyoD affects pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;85:C408-C413.
52. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-241.
53. Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2036-2046.
54. Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 2002;16:529-538.
55. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 1988;242:540-546.
56. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y. Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature.* 1998;396:590-594.
57. Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* 2000;10:129-133.

58. Acharyya S, Gutttridge DC. Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1356-1361.
59. Mann DL, Young JB. Basic mechanisms in congestive heart failure. Recognizing the role of proinflammatory cytokines. *Chest.* 1994;105:897-904.
60. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation.* 1997;96:526-534.
61. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 1992;257:387-389.
62. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:208-214.
63. Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Nortn GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation.* 2001;103:155-160.
64. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;33:60-65.
65. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 1997;69:381-384.
66. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, Aragon FF, Jamas E, Okoshi MP. Estudo evolutivo da morfologia e função

- cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81:562-568.
67. Helies-Toussaint C, Moinard C, Rasmusen C, Tabbi-Anneni I, Cynober L, Grynberg A. Aortic banding in rat as a model to investigate malnutrition associated with heart failure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2005;288:1325-1331.
68. Martinez PF, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Damatto RL, Gosuen GB, Iyomasa RM, Silva MB, Cezar MDM, Okoshi K, Okoshi MP. Caracterização clínica e anátomo-patológica da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88:14.
69. Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, Matsubara BB. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:607-613.
70. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res.* 2002;22:1353-1364.
71. Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol.* 2002;282:H1327-H1333.
72. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58:1072-1083.
73. Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail.* 1999;5:213-223.
74. Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SAR, Zornoff LAM. Comparison of different methods to measure

- experimental chronic infarction size in the rat model. *Arq Bras Cardiol.* 2007;89:83-87.
75. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation.* 1993;87:598-607.
76. Kalkman EAJ, van Suylen RJ, van Disk JPM, Saxena PR, Schoemaker RG. Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodelling after coronary artery ligation in rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2483-2494.
77. Martinez PF. Expressão dos fatores de regulação mio gênica, composição das miosinas e trofismo no músculo esquelético periférico de ratos com insuficiência cardíaca crônica. In: *Curso de Pós-Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica*; 2008:71 p.
78. Dubowitz V. *Muscle Biopsy: a Practical Approach.* 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.
79. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol.* 1993;75:2337-2340.
80. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237:H461-H468.
81. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJJ, Cuddy TE, al. e. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992;327:669-677.
82. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol.* 1991;260:H136-H145.

83. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
84. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995;91:161-170.
85. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000;89:1445-1454.
86. Tikunov B, Levine S, Mancini D. Chronic congestive heart failure elicits adaptations of endurance exercise in diaphragmatic muscle. *Circulation.* 1997;95:910-916.
87. Sugiura T, Morita AM, Murakami N. Regional differences in myosin chain isoforms and enzyme activities of rat diaphragm. *J Appl Physiol.* 1992;73:506-509.
88. Supinski G, DiMarco A, Dibner-Dunlap M. Alterations in diaphragm strength and fatigability in congestive heart failure. *J Appl Physiol.* 1994;76:2707-2713.
89. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation.* 2000;102:1847-1853.
90. Bernocchi P, Cargnoni A, Vescovo G, Libera LD, Parrinello G, Boraso A, Ceconi C, Ferrari R. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol.* 2003;98:114-123.
91. Spangenburg EE, Lees SJ, Otis JS, Musch TI, Talmadge RJ, Williams JH. Effects of moderate heart failure and functional overload on rat plantaris muscle. *J Appl Physiol.* 2002;92:18-24.
92. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic

- heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and increased MyoD gene expression. *Muscle Nerve*. 2010;Submitted.
93. Hughes C, Kostka P. Chronic congestive heart failure. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern nutrition in health and disease*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999:1229-1234.
94. Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, Gundersen K. Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol*. 2003;548:259-269.
95. Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, van der Velden JLJ, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C714-C721.
96. Perry RL, Rudnicki MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci*. 2000;5:D750-D767.
97. Loughna PT, Brownson C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. *FEBS Letter*. 1996;390:304-306.
98. Smith CK, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*. 1994;159:379-385.
99. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-238.
100. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang C-Y, Baldwin Jr. AS. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289:2363-2366.
101. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alfa causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation*. 2000;102:1690-1696.

102. Aimbire F, Lopes-Martins AB, Castro-Faria-Neto HC, Albertini R, Chavantes MC, Pacheco MTT, Leonardo PSLM, Iversen VV, Bjordal JM. Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. *Lasers Med Sci.* 2006;21:238-244.
103. Mozdziak PE, Geaser ML, Schultz E. Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J Appl Physiol.* 1998;84:1359-1364.
104. Toth MJ, Ades PA, LeWinter MM, Tracy RP, Tchernof A. Skeletal muscle myofibrillar mRNA expression in heart failure: relationship to local and circulating hormones. *J Appl Physiol.* 2006;100:35-41.
105. Dalla Libera L, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB, Vescovo G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1999;277:C982-C986.
106. Cheema IR, Hermann C, Postell S, Barnes P. Effect of chronic excess of tumour necrosis factor-alpha on contractile proteins in rat skeletal muscle. *Cytobios.* 2000;103:169-176.
107. Wilcox PG, Wakai Y, Walley KR, Cooper DJ, Road J. Tumor necrosis factor alpha decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:1368-1373.
108. Gosselin LE, Barkley JE, Spencer MJ, McCormick KM, Farkas GA. Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumor necrosis factor-alpha deletion. *Muscle Nerve.* 2003;28:336-343.