

Paula Felipe Martinez

**Expressão dos Fatores de Regulação Miogênica,
Composição das Miosinas e Trofismo no
Músculo Esquelético Periférico de Ratos com
Insuficiência Cardíaca Crônica**

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

Orientador: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

Co-Orientador: Profa. Adja. Maeli Dal Pai-Silva

Botucatu – São Paulo
2008

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

Martinez, Paula Felipe.

Expressão dos fatores de regulação miogênica, composição das Miosinas e Trofismo no músculo esquelético periférico de ratos com insuficiência cardíaca crônica / Paula Felipe Martinez. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientadora: Marina Politi Okoshi

Co-Orientador: Maeli Dal Pai-Silva

Assunto CAPES: 40101100

1. Insuficiência cardíaca crônica 2. Coração – Doenças

CDD 616.12

Palavras-chave: Citocinas; Fatores de regulação miogênica; Insuficiência cardíaca; Músculo esquelético;

“A vida não nos exige sacrifícios inimagináveis; pede-nos para que façamos a jornada com alegria no coração e que sejamos uma bênção a quantos nos rodeiam, de forma que se deixarmos o mundo um pouquinho melhor do que era antes de nossa visita, teremos feito o nosso trabalho.”

(EDWARD BACH)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Paulo e Lilian*, à minha irmã *Rejane*,
à minha sobrinha *Lara*, à vovó *Drene (in memorian)*, à
tia *Beth (in memorian)* e ao *Silvio*, meu namorado.

AGRADECIMENTOS

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) pelo apoio financeiro (processos nº 05/58294-3 e nº 05/60767-7).

Ao Prof. Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF, pela realização da cirurgia dos animais e por esclarecer minhas dúvidas sempre com paciência e bom humor.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela avaliação ecocardiográfica dos ratos e pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

Aos Professores Dr. LUIS SHIGUIERO MATSUBARA e Dr. SÉRGIO ALBERTO RUPP PAIVA, pelas valiosas sugestões proferidas no exame de qualificação.

Ao Prof. Titular Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, por me acolher em seu grupo e fortalecer a minha paixão pela pesquisa.

À Profa. Dra. CÉLIA REGINA NOGUEIRA, por abrir as portas do seu laboratório e pelos ensinamentos sobre Biologia Molecular.

Ao Prof. Titular Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI, pelo auxílio com a análise estatística, por transmitir conhecimento de forma tão generosa e, principalmente, pela acolhida em sua casa.

À Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA, pela co-orientação neste trabalho, pela delicadeza com que sempre me ajudou e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela competência na orientação, dedicação, perseverança, otimismo e bom humor, qualidades que tornaram mais leve e fácil a realização do trabalho. Nossa convivência contribuiu muito para meu amadurecimento profissional e pessoal. - Obrigada pelo respeito e por confiar na minha capacidade!

Ao ROBSON FRANCISCO CARVALHO, que iniciou os estudos sobre alterações da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca no laboratório, sob orientação da Profa. MAELI, e sempre foi muito solícito quando precisei de sua ajuda.

Aos funcionários do Laboratório Experimental da Clínica Médica, ANTÔNIO CARLOS DE LALLA, CAMILA RENATA CAMACHO, CORINA JULIETA CORRÊA, ELENIZE JAMAS PEREIRA, JOSÉ APARECIDO DE SOUZA, JOSÉ CARLOS GEORGETE, MÁRIO BAPTISTA BRUNO, ROGÉRIO MONTEIRO, SANDRA ÂNGELA FÁBIO, SUELI CLARA, VÍTOR MARCOS SOUZA, pela convivência agradável e pelo auxílio na realização do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, ANA MARIA MENGUE, ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, RENATO BORGES PEREIRA, pela gentileza com que sempre me ajudaram.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECÃO DE PÓS-GRADUACÃO, pela disponibilidade e eficiência para resolver problemas.

Ao pessoal do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, FERNANDA CARANI, FERNANDA LOSI, FRANCIS e SUELI, pela boa convivência e pela ajuda nos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica, GUILHERME, JOÃO, LORENA, MÁRCIA, MARIANA e RENATA, pela parceria nos trabalhos do grupo.

Aos amigos do laboratório, ANDRÉ LEOPOLDO, ANDRÉ NASCIMENTO, CRISTIANA, GIOVANA, LORETA, MARCELO, MARCOS (Meleca), MARIA TERESA, OLGA, PAULA GAIOLLA, RENATA, RICARDO, ROSÂNGELA, SANDRO, SÉRGIO, pelo auxílio na realização dos experimentos, pela amizade e pelos momentos de descontração!

À ANA PAULA, primeira pessoa a me acolher em Botucatu, num momento de transição na minha vida. Ofereceu sua amizade e dividiu comigo seus conhecimentos sobre Biologia Molecular. - Serei eternamente grata!

Ao DIJON e à ALINE, dois grandes amigos, pessoas extremamente amáveis e leais, que foram fundamentais para a realização

deste trabalho. - A convivência com vocês foi um presente para mim!
Adoro vocês!

Às minhas amigas BRUNA e TALITA, por torcerem pelo meu sucesso e por me oferecerem sempre um abraço carinhoso nos nossos reencontros. - Amo vocês, irmãzinhas!

À Profa. MARIA DE LOURDES e à MARILSA, pessoas importantíssimas na minha formação acadêmica. - Vocês estarão sempre no meu coração!

À tia LILIANE, minha madrinha, e à tia ANITA, que sempre torceram por mim e vibraram com as minhas conquistas.

À tia BETH, pelo carinho de mãe que a mim dedicou, e à vovó IRENE, meu anjo da guarda. *“As pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa.”* (William Shakespeare)

À minha irmã REJANE e minha sobrinha LARA, que compreenderam a minha ausência e sempre me receberam com muito carinho nas minhas idas para Prudente. - Amo vocês!

Ao SILVIO, meu namorado, companheiro na vida pessoal e no trabalho, que me amparou durante toda essa caminhada e fez minha vida mais alegre e divertida. - A minha felicidade é dobrada porque você também alcançou seus objetivos. Tenho muito orgulho de ser sua namorada! Te amo muito!

Aos meus pais, PAULO e LILIAN, fontes de inspiração por sua luta e trabalho árduos, dignidade, honestidade e integridade. Apoiaram incondicionalmente a minha decisão de vir para Botucatu e suportaram firmemente a saudade. - O amor de vocês me fortalece e me dá segurança para seguir em frente! Amo muito vocês!

A DEUS, por abençoar minha vida e colocar tantas pessoas especiais em meu caminho!

SUMÁRIO

Introdução	1
Objetivo	7
Material e Métodos	9
Resultados	20
Discussão	43
Resumo	53
Abstract	56
Referências Bibliográficas	59

LEGENDA DAS TABELAS E FIGURAS

Legenda das Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
Tabela 2. Parâmetros corporais dos animais	26
Tabela 3. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração	27
Tabela 4. Avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma	28

Legenda das Figuras

- Figura 1.** Amplificação simultânea do gene alvo e da ciclofilina (duplex). Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 29
- Figura 2.** Cortes histológicos do músculo sóleo corados com hematoxilina-eosina. A) Grupo Sham (n=9): fibras musculares normais. B e C) Grupo IM/IC- (n=9): presença de fibras grandes, arredondadas e acidófilas (*); áreas focais e esparsas com necrose celular, acompanhada de infiltrado inflamatório e fagocitose (•). D) Grupo IM/IC+ (n=9): áreas de necrose foram observadas mais freqüentemente envolvendo grupamentos maiores de fibras musculares (→), com infiltrado de células inflamatórias e fagocitose 30
- Figura 3.** Cortes histológicos do músculo sóleo corados pela técnica de ATPase miofibrilar (pré-incubação em pH 4,32). As fibras musculares foram classificadas como tipo I, IC/IIC ou IIA. A) Grupo Sham (n=9); B) Grupo IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; C) Grupo IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca .. 31
- Figura 4.** Área seccional transversa das fibras I, IC/IIC e IIA do músculo sóleo. Sham (n=9); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. *p<0,05 versus Sham 32
- Figura 5.** Diagrama de dispersão entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC) e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson 33
- Figura 6.** Distribuição de freqüência das fibras I, IC/IIC e IIA do músculo sóleo. IM/IC-: animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste de Goodman. * p<0,05 versus Sham; #p<0,05 versus IM/IC- 34
- Figura 7.** Expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MRF) no músculo sóleo analisada por meio da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). A expressão gênica dos MRF foi normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Sham (n=9); IM/IC- (n=7): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=6): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados normalizados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. * p<0,05 versus Sham 35
- Figura 8.** Diagrama de dispersão entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC) e a expressão dos fatores de regulação miogênica miogenina (em A), MyoD (em B) e MRF4 (em C); correlação de Pearson 36
- Figura 9.** Diagrama de dispersão entre a expressão de miogenina e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson 37

Figura 10.	Distribuição das isoformas das cadeias pesadas de miosina (MyHC) no músculo sóleo analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio. A quantidade de cada isoforma de MyHC foi expressa em relação à quantidade total de MyHC. Sham (n=9); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA	38
Figura 11.	Concentração sérica de TNF- α (A) e interleucina-6 (B). A dosagem das citocinas foi realizada por ELISA. Sham (n=8); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=11): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey.*p<0,05 versus Sham; #p<0,05 versus IM/IC-	39
Figura 12.	Diagrama de dispersão entre a concentração sérica de TNF- α e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson	40
Figura 13.	Diagrama de dispersão entre a concentração de citocinas circulantes e a expressão dos fatores de regulação miogênica; correlação de Pearson	41
Figura 14.	Representação esquemática de hipótese para justificar os achados deste estudo. +: estimula; -: inibe; ROS: espécies reativas de oxigênio; SRA: sistema renina-angiotensina; NF- κ B: fator nuclear kapa B	42

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca crônica constitui um problema clínico de grande importância devido à gravidade de suas manifestações e à sua grande prevalência. Estatísticas dos Estados Unidos mostram que a prevalência de insuficiência cardíaca é variável de acordo com a idade, ocorrendo em 1,5 a 2% da população total e chegando a atingir 6 a 10% das pessoas com mais de 65 anos de idade ¹. No Brasil, conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a insuficiência cardíaca encontra-se entre as principais causas de internação hospitalar, considerando-se todas as internações do Sistema Único de Saúde ^{2,3}.

A insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se por reduzida tolerância aos exercícios físicos com ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento desses sintomas em pacientes com insuficiência cardíaca crônica vêm sendo estudados nas últimas décadas ⁴. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para exercícios com a ocorrência precoce de sintomas era causada por diminuição da capacidade funcional do coração e pulmão, pobre perfusão tecidual causada por redução do débito cardíaco e/ou disfunção endotelial e inatividade física. 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 ⁵.

Mais recentemente, como foram observadas diversas alterações em músculos esqueléticos periféricos durante a insuficiência cardíaca, foi sugerido que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética também pudessem ter papel importante na determinação da capacidade para exercícios físicos ⁵⁻⁸. Assim, o conjunto das alterações musculares que ocorrem em doentes com falência cardíaca foi denominado de miopatia associada à insuficiência cardíaca ⁹.

Alterações metabólicas envolvendo enzimas oxidativas e lipolíticas foram descritas em biopsias de músculos esqueléticos de doentes com insuficiência cardíaca e foram relacionadas à redução da tolerância aos exercícios físicos ^{10,11}. Diminuição da capacidade de desenvolver força por unidade de área muscular foi observada em pacientes com insuficiência cardíaca avançada e caquexia ¹², indicando piora da função contrátil nesses doentes. Em estudos

experimentais com insuficiência cardíaca crônica, foram confirmadas as anormalidades da fosforilação oxidativa na musculatura periférica ¹³ e a redução da capacidade muscular para desenvolver força ^{14,15}.

Além das alterações metabólicas e funcionais, foram descritas importantes anormalidades estruturais e bioquímicas na musculatura esquelética de doentes com insuficiência cardíaca. Atrofia de músculos esqueléticos foi observada em 68% dos pacientes com insuficiência cardíaca crônica ¹⁶, principalmente na musculatura dos membros inferiores ¹². Alteração na densidade capilar com redução da relação capilar:fibra muscular foi observada em músculos de ratos com insuficiência cardíaca ¹⁷; entretanto, esse fator não parece ser importante na limitação aos exercícios físicos em humanos ¹⁸. Fibrose ¹⁹ e aumento da atividade de metaloproteases foram descritos em estudos experimentais ²⁰. Também foram observadas alterações na composição das cadeias pesadas das moléculas de miosinas e no padrão das fibras musculares esqueléticas, com aumento das fibras tipo II, rápidas, e redução das fibras tipo I, lentas ²¹.

Embora o mecanismo fisiopatológico responsável pelas alterações musculares esqueléticas seja ainda desconhecido, algumas causas têm sido responsabilizadas pelo desenvolvimento da miopatia. Entre elas destacam-se: inatividade física; anormalidades neuroendocrinológicas como resistência ao hormônio do crescimento, redução dos níveis séricos de IGF-1 (insulin like growth factor-1) e aumento das concentrações séricas de catecolaminas, angiotensina II e cortisol ²²⁻²⁴; ativação inflamatória, caracterizada principalmente pelo aumento dos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e da interleucina-6 ²⁵⁻³² e aumento da produção de radicais livres ^{15,33}.

Entre as alterações da musculatura esquelética acima referidas, as mais intrigantes, e freqüentemente observadas em trabalhos clínicos ^{25,26,34,35} e experimentais ^{29,36-39}, são a atrofia muscular e a alteração na composição das cadeias pesadas das moléculas de miosinas.

O sarcômero é a unidade contrátil fundamental da fibra muscular e é constituído por proteínas estruturais e contráteis. Entre as proteínas contráteis, destaca-se a miosina, hexâmero formado por duas cadeias pesadas de

miosina (MyHC) e quatro cadeias leves de miosina. A cadeia pesada da miosina apresenta uma porção globular com atividade ATPásica. De acordo com a composição das isoformas das MyHC, as fibras musculares podem ser definidas como rápidas ou lentas. Os músculos esqueléticos de ratos adultos expressam uma isoforma lenta e três isoformas rápidas de MyHC ⁴⁰. A isoforma lenta é denominada MyHC I, que corresponde à isoforma cardíaca MyHC β ⁴¹. As três isoformas rápidas são MyHC IIa, MyHC IId e MyHC IIb ⁴². Em alguns estudos, a MyHC IId também tem sido referida como MyHC IIx ^{43,44}. As fibras determinadas histoquimicamente como tipo I expressam MyHC I e as fibras rápidas IIA, IID e IIB expressam MyHC IIa, MyHC IId e MyHC IIb, respectivamente ⁴⁵. A maioria das fibras normalmente expressa apenas uma isoforma de MyHC e são denominadas fibras puras. Entretanto, sob condições normais, também é possível encontrar fibras híbridas, que co-expressam duas isoformas de MyHC. Por exemplo, fibras contendo MyHC I e MyHC IIa são classificadas como fibras tipo IC (em que há predominância de MyHC I) ou tipo IIC (em que há predominância de MyHC IIa), fibras que expressam MyHC IIa e MyHC IId são do tipo IIAD e aquelas que contêm MyHC IId e MyHC IIb são do tipo IIDB ⁴⁶. Os músculos estriados são constituídos por diferentes tipos de fibras e suas características morfológicas, metabólicas e funcionais podem apresentar variações na dependência de estímulos como hipóxia, estimulação elétrica, imobilização e exercício físico ³⁹.

Na insuficiência cardíaca crônica, a atrofia das fibras musculares e a mudança na composição das miosinas, com aumento das isoformas II e redução das isoformas I, estão relacionadas à gravidade da doença ^{37,47} e a alteração das miosinas pode ocorrer independentemente de variações no nível de atividade física ⁴⁸. Interessantemente, em nosso laboratório verificamos que a alteração do fenótipo muscular caracterizada por diminuição da frequência de fibras do tipo I e de MyHC I e aumento de fibras do tipo IIa e de MyHC IIa está presente durante a insuficiência cardíaca e, também, na fase de hipertrofia ventricular compensada que antecede o desenvolvimento da falência cardíaca. Atrofia muscular foi verificada apenas durante a insuficiência cardíaca ³⁸. Esse estudo sugere que as alterações da musculatura esquelética são mediadas por fatores bioquímicos e/ou

neurohormonais associados ao quadro de injúria do coração e não estão diretamente relacionadas à presença de insuficiência cardíaca.

As causas responsáveis pela atrofia das fibras musculares e pelas alterações das isoformas da MyHC na insuficiência cardíaca ainda não estão definidas. Tem sido descrito que ativação de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e interleucina-6, redução da síntese protéica e/ou aumento do catabolismo muscular, diminuição da atividade neuromuscular e ocorrência de apoptose podem estar envolvidos nessas alterações ³⁸. Do mesmo modo, não são conhecidos os mecanismos moleculares e as vias sinalizadoras que controlam o trofismo muscular e a expressão gênica das MyHC nos músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca. Há substancial evidência que os fatores de regulação miogênica (MRF) MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 atuem como importantes reguladores da expressão de proteínas musculares ⁴⁹⁻⁵². 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 miogenina é expressa em maior quantidade que a MyoD em músculos lentos, enquanto o oposto ocorre em músculos rápidos ⁴⁹. A redução da expressão do MRF4 está associada a diminuição do trofismo muscular ⁵³. A MyoD é associada à expressão das isoformas da miosina tipo IIX e IIB. Além disso, encontra-se aumentada em situações de ativação e proliferação de células satélites, que são precursoras dos miócitos e responsáveis pela regeneração dos músculos esqueléticos ^{50,54,55}. Alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica podem estar diretamente envolvidas no controle da expressão gênica das fibras em resposta a estímulos externos como hipotireoidismo e anomalias da inervação do músculo esquelético ^{56,57}. Atualmente, tem sido muito estudado o papel do TNF- α na miogênese e na modulação da expressão gênica da miogenina e da MyoD na musculatura esquelética ^{58,59}.

Em nosso laboratório, observamos alteração da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica na musculatura esquelética periférica e no diafragma de ratos com insuficiência cardíaca induzida por hipertensão pulmonar. Nos músculos periféricos, foi verificada redução dos níveis de mRNA

para MyoD e MRF4 com atrofia e preservação das MyHCs. No diafragma, a alteração da expressão protéica das MyHCs foi acompanhada por redução da expressão do RNAm para MyoD ³⁹. Entretanto, como esse modelo experimental cursa com insuficiência cardíaca direita e de desenvolvimento rápido, não se sabe se esses achados são válidos para modelo experimental de insuficiência cardíaca esquerda crônica, semelhante à que se observa comumente em humanos.

Nesse trabalho, testamos a hipótese que a ocorrência de atrofia muscular e de modificação na composição das miosinas da musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca crônica são acompanhadas por alterações na expressão gênica dos fatores de regulação miogênica.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o trofismo, a composição das cadeias pesadas de miosina e a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos com disfunção ventricular, sem insuficiência cardíaca e com insuficiência cardíaca crônica. Como o TNF e a IL-6 estão aumentados na insuficiência cardíaca e associados a alterações musculares, analisamos também suas concentrações séricas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo número 505.

Indução de infarto do miocárdio

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e com ciclos de luminosidade de 12 h. Os ratos 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 ⁶⁰. 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 inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com fio de algodão 10. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária. Após o procedimento cirúrgico, foram constituídos dois grupos de animais: ratos controle (Sham) e ratos com infarto do miocárdio (IM).

Ao final do período experimental, de seis meses, os ratos foram avaliados clinicamente para a detecção de taquipnéia/dispnéia. No momento da eutanásia, foram avaliados os seguintes sinais anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca: ascite, congestão hepática, derrame pleuropericárdico, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do

ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/kg) ⁶¹⁻⁶⁵. Após a eutanásia, os ratos com infarto do miocárdio foram subdivididos em dois grupos: 1) grupo infarto do miocárdio com insuficiência cardíaca (IM/IC+), constituído pelos animais que apresentaram dois ou mais sinais clínico e/ou anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca, e 2) grupo infarto do miocárdio sem insuficiência cardíaca (IM/IC-), constituído pelos animais que não apresentaram nenhum dos sinais clínico e/ou anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca. Os ratos que apresentaram apenas um sinal clínico ou anátomo-patológico de insuficiência cardíaca foram excluídos do trabalho.

Avaliação Estrutural e Funcional do Coração pelo Ecocardiograma

Para certificar que os dois grupos de ratos infartados tinham disfunção ventricular ao final do período experimental, foram avaliadas a estrutura e a função cardíaca por ecocardiograma transtorácico. Foi utilizado equipamento da Philips (HDI 5000) dotado de transdutor eletrônico multifrequencial operando em 12 MHz.

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do exame. As variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório ⁶⁶⁻⁶⁸. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente, em cinco ciclos cardíacos consecutivos, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography ⁶⁹, validadas no modelo de ratos infartados ⁷⁰.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), a espessura diastólica da parede posterior (EDPP) e a espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) foram mensurados no momento do ciclo cardíaco correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi obtido no momento em que a cavidade apresentava o diâmetro mínimo. Foram mensurados também os diâmetros do

átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO). A função sistólica do VE foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de encurtamento endocárdico ($\Delta D = (DDVE-DSVE)/DDVE \times 100$) e pela velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). O fluxo diastólico transmitral foi obtido com o transdutor colocado na posição apical quatro câmaras, permitindo as medidas da onda E (E), onda A (A) e do tempo de desaceleração da onda E (TDE). O tempo entre o final da ejeção e o início do enchimento diastólico ventricular, correspondente ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), foi também mensurado. A frequência cardíaca (FC) foi calculada pelo intervalo de tempo entre dois batimentos consecutivos.

Eutanásia e Coleta de Tecidos para Análise

Dois dias após a realização do ecocardiograma, os animais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios, o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE), incluindo o septo, foram dissecados e pesados separadamente. O sangue foi centrifugado a 4 °C; amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C até o momento das dosagens de TNF- α e interleucina-6.

A seguir, foram dissecados os músculos sóleos dos membros pélvicos direito e esquerdo. O tecido epitelial do membro pélvico foi removido e o músculo gastrocnêmio rebatido, possibilitando a retirada do músculo sóleo. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C.

Fragmentos de pulmão, fígado e ventrículo direito foram colhidos para calcular a relação peso úmido/peso seco e avaliar o grau de edema nos tecidos.

Análise Histológica do Coração

Amostras anelares do VE foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 48 horas, de acordo com o método previamente descrito⁷¹.

Para cálculo do tamanho do infarto, foi realizado corte do VE na distância de 5 a 6 mm do ápice. Os valores obtidos nesta região correspondem à média dos valores obtidos em cortes de todo o coração ⁷². Os cortes histológicos foram corados em lâmina com hematoxilina e eosina e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais ⁷³. O valor foi expresso em porcentagem do VE.

Análise Histológica da Musculatura Esquelética

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20°C), onde permaneceram por 20 a 30 min 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. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina e pela técnica de ATPase miofibrilar (pré-incubação em pH 4,32), conforme previamente descrito ⁷⁴. A coloração hematoxilina e eosina foi utilizada para avaliação da morfologia geral dos músculos. A técnica ATPase miofibrilar permite mensurar, separadamente, as fibras do tipo II, de contração rápida, e as fibras do tipo I, de contração lenta. A área seccional das fibras musculares foi avaliada em sistema de análise por imagem computadorizada utilizando a técnica de Pearse modificada por Dubowitz ⁷⁵. Para cada animal, foram medidos, em média, 15 campos, totalizando 150 a 200 fibras. Nesses campos, foi avaliada também a frequência de cada tipo de fibra.

Análise do mRNA dos Fatores de Regulação Miogênica por RT-PCR Semi-quantitativo

A análise da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina e MRF4 e do gene constitutivo ciclofilina foi realizada por reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) semi-quantitativa de acordo com a técnica previamente descrita em nosso laboratório ^{76,77}.

Extração de RNA com TRIzol

O fragmento muscular congelado foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido). A solução foi coletada, transferida para tubo e incubada por 5 min à temperatura ambiente para permitir completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente. 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 intermédio 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 formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado), centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C, e secado por 10 min à temperatura ambiente. A seguir, foi ressuspensão em solução 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado em banho-maria 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, o que fornece uma estimativa da qualidade do processo de extração.

Gel Analítico de Agarose para RNA

Para analisar a integridade do RNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose (1%), em tampão TAE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), à voltagem de 60 V por 20 min. Foi aplicado 1 µL da solução contendo o RNA total acrescido de 1 µL de corante Orange e 8 µL de água tratada com DEPC.

Transcrição Reversa (RT) do RNA

A transcrição reversa do RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se os componentes do Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Brasil). A solução contendo 1 µg de RNA total, 1 µL de dNTP mix (nucleotídeos) 10 mM e 1 µL de Random Hexamers (50 ng/µL), com volume total ajustado para 10 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), foi incubada por 5 min a 65 °C. A seguir, foram adicionados 9 µL de solução contendo 2 µL de tampão para transcrição reversa 10x (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 1 µL de inibidor de RNase recombinante RNaseOUT™ (40 unidades/µL). Após leve agitação e incubação a 25 °C por 2 min, foi adicionado à reação 1 µL da enzima SuperScript™ II RT (50 unidades/µL) e a mistura foi incubada por 10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C e 15 min a 70 °C. A seguir, foi adicionado 1 µL de RNase H e a reação foi incubada por 20 min a 37 °C. Para verificar a eficiência da reação de RT, o Kit fornece um RNA controle transcrito a partir do gene da cloranfenicol acetiltransferase (controle positivo da RT), de 891 pares de bases (pb), e primers controle A e B. Esses primers, na reação de RT-PCR, geram a partir do RNA controle, um produto de 500 pb. Para comprovar a ausência de DNA genômico residual nas amostras de RNA submetidas à reação de RT, uma amostra de RNA (controle negativo da RT) foi submetida à reação de RT acima descrita com a substituição da enzima SuperScript™ II RT por 1 µL de água tratada com DEPC. O produto de reação foi utilizado em todas as PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

Validação da RT-PCR Semi-quantitativa

Para quantificar comparativamente a expressão dos genes alvo, a RT-PCR semi-quantitativa foi validada. Amostras de RNA total provenientes de animais controle foram utilizadas, para que a RT-PCR semi-quantitativa fosse validada para o grau de expressão semelhante ao das amostras a serem posteriormente quantificadas. A RT-PCR semi-quantitativa para fatores de regulação miogênica foi validada amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo ciclofilina simultaneamente (duplex, figura 1).

Primers

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (primers) para a reação de PCR do produto de RT do RNA total extraído foram para os genes alvo MyoD, miogenina e MRF4 e para o gene constitutivo ciclofilina. Os primers utilizados para a reação de PCR, do produto da RT do RNA controle, foram os primers controle A e B, fornecidos pelo kit. As seqüências das bases nitrogenadas dos oligonucleotídeos iniciadores para os genes alvo e para a ciclofilina estão descritas na tabela 1.

PCR

Para a reação de PCR, alíquotas de 1,5 µl da reação de RT foram adicionadas a 23,5 µl de uma mistura contendo 17,3 µl de água tratada com DEPC, 2,5 µl de tampão para PCR 10X, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl de primer sense para gene alvo (10 µM), 0,5 µl de primer antisense para o gene alvo (10 µM), 0,5 µl de primer sense para gene constitutivo (10 µM), 0,5 µl de primer antisense para o gene constitutivo (10 µM) e 0,2 µl de Taq polimerase por amostra. Essa mistura foi, então, aquecida a 94°C por 2 min para desnaturação das moléculas de cDNA. Posteriormente, foram realizados 32 ciclos de desnaturação (94°C; 1 min), anelamento (60,3°C para MyoD e MRF4 e

58,9°C para miogenina; 1 min) e extensão (72°C; 1 min), seguido de um ciclo de extensão a 72°C por 10 min.

Após a termociclagem, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, com tampão TAE, a 80 V por 25 min. O gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultra-violeta. As bandas foram quantificadas por densitometria. Para a detecção de diferenças relativas na integridade das amostras de RNA individuais, foi realizada a normalização da quantidade do produto da reação do transcrito do gene alvo para a quantidade de produto da reação do transcrito do gene ciclofilina.

Avaliação das Isoformas das Cadeias Pesadas da Miosina por Eletroforese

A análise das isoformas das cadeias pesadas de miosina foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Fragmentos congelados de músculo sóleo (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). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C por 20 min para remover o material insolúvel. A alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação de proteína total pelo método de Bradford ⁷⁸. Para a corrida eletroforética, parte do sobrenadante foi diluído para uma 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). Porções dos extratos diluídos (12 µL) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio em gradiente (7 a 10%) com gel de empacotamento a 4% por 21 h a 70 V ³⁸. 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 foram quantificadas por densitometria. Como padrão, foi utilizado extrato do músculo extensor longo dos dedos de um animal controle.

Dosagem do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF α) e Interleucina-6 Circulantes

As concentrações séricas de TNF- α foram mensurados utilizando-se o kit ELISA TNF- α ultra-sensível para ratos (Biosource International, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 100 μ L das amostras de soro (diluição 1:2) e os padrões foram pipetados em duplicata na placa e acrescidos de 50 μ L de anti-TNF- α biotilado. A placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente e, a seguir, as amostras foram aspiradas e os poços lavados quatro vezes. Cem microlitros de solução conjugada de estreptavidina-HRP (horseradish peroxidase) foram adicionados e a placa foi novamente incubada por 30 min em temperatura ambiente. O procedimento de lavagem foi repetido quatro vezes. Finalmente, 100 μ L de cromógeno estável foram colocados e as amostras incubadas no escuro por 30 min. A reação foi interrompida com 100 μ L de solução de interrupção. A leitura das amostras foi realizada a 450 nm utilizando-se um leitor de placa de ELISA. A curva-padrão foi efetuada utilizando-se solução padrão fornecida pelo fabricante. A sensibilidade do kit é de < 0,7 pg/mL e a abrangência de 2,3 a 150 pg/mL.

A dosagem de interleucina-6 no soro foi realizada utilizando-se o kit ELISA IL-6 para ratos (Biosource International, CA, EUA), seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Em resumo, 50 μ L de tampão de diluição e 50 μ L das amostras de soro em duplicata foram adicionados à placa, 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 1h em temperatura ambiente e lavados quatro vezes. Cem microlitros de solução conjugada de estreptavidina-HRP (horseradish peroxidase) foram adicionados e 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 lidas a 450 nm utilizando-se um leitor de placa de ELISA. A curva-padrão foi efetuada utilizando-se solução padrão fornecida pelo fabricante. A sensibilidade do kit é de < 0,8 pg/mL e a abrangência de 31,2 a 2000 pg/mL.

Análise Estatística

Os dados tiveram distribuição normal e estão expressos em média e desvio padrão. A comparação entre os três grupos foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey. O teste *t* de Student foi usado para comparar o tamanho do infarto entre os grupos IM/IC- e IM/IC+. O grau de associação entre as variáveis foi verificado pelo cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson. Para o estudo da distribuição de frequência dos tipos de fibras musculares segundo o grupo, foi utilizado o teste de Goodman. O nível de significância considerado foi de 5%.

4. RESULTADOS

Caracterização dos Grupos Experimentais e Variáveis Corporais

Para caracterizar a presença de insuficiência cardíaca, os sinais que permitem o diagnóstico de insuficiência cardíaca em ratos foram pesquisados *in vivo* e em exame *post mortem*. No grupo IM/IC+ (n=11), os sinais de insuficiência cardíaca estiveram presentes na seguinte frequência: taquipnéia/dispnéia em sete animais, derrame pleuropericárdico em sete, ascite em quatro, congestão hepática em três, trombo em átrio esquerdo em dois e hipertrofia do ventrículo direito em todos os ratos. Nos grupos Sham (n=9) e IM/IC- (n=11), nenhum animal apresentou quaisquer dos sinais de insuficiência cardíaca.

As variáveis corporais dos animais estão expostas na tabela 2. O peso corporal (PC) dos animais foi menor no grupo IM/IC+ em relação ao grupo Sham. O peso do VE foi semelhante entre os três grupos e a relação VE/PC foi maior no grupo IM/IC+ quando comparado ao grupo Sham. O peso do VD e dos átrios e as relações VD/PC e átrios/PC foram maiores no grupo IM/IC+ em relação aos demais grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos Sham e IM/IC- nas variáveis PC, VD, átrios, VE/PC, VD/PC e átrios/PC. As relações entre peso úmido e peso seco do pulmão e fígado foram maiores no grupo IM/IC+ que no Sham; no grupo IM/IC-, as relações foram semelhantes às dos grupos Sham e IM/IC+. Para VD, esta relação foi semelhante entre os grupos. O peso do músculo sóleo, absoluto ou normalizado para o PC, foi semelhante entre os grupos.

A porcentagem de área infartada do ventrículo esquerdo foi maior no grupo IM/IC+ ($41,1 \pm 6,3$ %) que no IM/IC- ($28,7 \pm 9,0$ %; $p=0,001$).

Avaliação Ecocardiográfica

Os parâmetros estruturais cardíacos estão apresentados na tabela 3. Os diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (DDVE e DSVE, respectivamente), o diâmetro do átrio esquerdo (AE), a relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta (AE/AO) e os valores de DDVE e AE normalizados pelo peso corporal foram significativamente maiores no grupo IM/IC+ que nos demais grupos e também maiores no grupo IM/IC- em relação ao

grupo Sham. O diâmetro da aorta e a espessura diastólica do septo interventricular e da parede posterior do VE não diferiram entre os grupos.

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 foi semelhante entre os grupos IM/IC- e IM/IC+ e menor que no grupo Sham. A velocidade de encurtamento da parede posterior do VE foi significativamente menor no grupo IM/IC+ que nos demais grupos e menor também no grupo IM/IC- em relação ao Sham. A onda A mitral foi menor no grupo IM/IC+ em relação aos outros grupos e foi maior no IM/IC- que no Sham. A onda E mitral e a relação E/A foram significativamente maiores no grupo IM/IC+ em comparação aos outros dois grupos e não diferiram entre IM/IC- e Sham. O tempo de desaceleração da onda E mitral foi menor no grupo IM/IC+ que no Sham e o tempo de relaxamento isovolumétrico do VE foi maior no grupo IM/IC- que nos outros dois grupos.

Análise Histológica da Musculatura Esquelética

A avaliação morfológica geral da musculatura esquelética foi realizada em lâminas coradas por hematoxilina e eosina (figura 2). No grupo Sham, as fibras musculares eram normais. No grupo IM/IC-, as fibras apresentaram variação de diâmetro, sendo observadas no mesmo campo fibras grandes e pequenas. Algumas fibras grandes eram arredondadas e com áreas acidófilas em seu interior; processo de “splitting” celular foi comumente encontrado nessas fibras. Áreas focais e esparsas com necrose isolada de uma única fibra muscular ou de um grupo de fibras foram observadas em todos os animais. A necrose celular foi acompanhada de infiltrado de células inflamatórias e de áreas com fagocitose da fibra muscular. Alterações semelhantes às observadas no grupo IM/IC- foram também verificadas nos animais do grupo IM/IC+. Entretanto, em quatro dos nove ratos estudados do grupo IM/IC+, as áreas de necrose foram maiores e mais frequentes envolvendo grupamentos de fibras musculares. Nessas regiões, havia infiltrado de células inflamatórias, fagocitose e áreas de substituição celular por tecido fibroso.

A classificação das fibras foi realizada em lâminas coradas pela técnica ATPase miofibrilar (figura 3). As áreas seccionais das fibras dos tipos I, IC/IIC e IIA do músculo sóleo foram menores no grupo IM/IC+ que no Sham. O grupo IM/IC- teve comportamento intermediário em relação aos três tipos de fibras analisados, permanecendo semelhante a ambos os grupos, Sham e IM/IC+ (figura 4). Observamos correlação negativa entre as áreas das fibras dos tipos I, IC/IIC e IIA e a variável ecocardiográfica AE/PC (figura 5).

A frequência de fibras do tipo I, IC/IIC e IIA, em relação ao total de fibras analisadas, foi semelhante entre os grupos Sham e IM/IC+. No entanto, o grupo IM/IC- apresentou maior frequência de fibras IC/IIC e menor frequência de fibras IIA que os grupos Sham e IM/IC+ (figura 6).

Análise do mRNA dos Fatores de Regulação Miogênica por RT-PCR Semi-quantitativo

A expressão gênica da miogenina foi semelhante entre os grupos IM/IC- e IM/IC+ e significativamente diminuída em relação à expressão do grupo Sham (figura 7A). Houve tendência para o aumento da expressão de MyoD no grupo IM/IC+ ($p=0,078$; figura 7B). A expressão do MRF4 foi semelhante entre os grupos (figura 7C). A expressão da miogenina e do MRF4 foi correlacionada negativamente com a variável AE/PC; não houve correlação entre a expressão da MyoD e esta variável (figura 8). A área seccional das fibras I e IIA foi correlacionada positivamente com a expressão da miogenina (figura 9). Não houve correlação entre a área das fibras IC/IIC e a expressão da miogenina (figura 9) e entre a área seccional dos três tipos de fibras e a expressão da MyoD ou do MRF4 (dados não apresentados).

Avaliação da composição das cadeias pesadas de miosina (MyHC)

Foram detectadas as isoformas I e IIa de MyHC no músculo sóleo de todos os animais. A porcentagem da isoforma IIa em relação ao total das cadeias pesadas de miosina não diferiu entre os grupos (Sham $19,75 \pm 7,66$ %; IM/IC-

18,25 ± 6,45 %; IM/IC+ 19,44 ± 8,62 %; $p > 0,05$; figura 10). Não encontramos correlação significativa entre a porcentagem de MyHC IIa e os fatores de regulação miogênica.

Dosagem dos níveis séricos de citocinas

Os níveis séricos do TNF- α foram significativamente maiores no grupo IM/IC+ que no Sham ($p = 0,009$; figura 11A). Não houve diferença entre o grupo IM/IC- e os demais grupos. Os níveis circulantes de interleucina-6 foram maiores em IM/IC+ que nos grupos Sham e IM/IC-; não houve diferença entre os grupos Sham e IM/IC- ($p < 0,001$; figura 11B).

Como esperado, uma vez a concentração sérica de TNF- α e interleucina-6 é aumentada durante a insuficiência cardíaca, seus valores foram positivamente correlacionados com a variável AE/PC (TNF- α : $r = 0,568$, $p = 0,003$; interleucina-6: $r = 0,463$, $p = 0,05$). A área seccional das fibras dos tipos I, IC/IIC e IIA foi negativamente correlacionada com os valores da concentração sérica de TNF- α (figura 12). Não houve correlação entre os valores da área seccional dos três tipos de fibras e a concentração sérica de interleucina-6 (dados não apresentados).

A expressão da miogenina foi negativamente correlacionada com a concentração sérica de TNF- α (figura 13); não houve correlação entre a expressão de miogenina e a concentração de interleucina-6. Não observamos correlação significativa entre a expressão de MRF4 e a concentração sérica de TNF- α (figura 13) ou de interleucina-6. A expressão da MyoD foi positivamente correlacionada com a concentração sérica de interleucina-6 (figura 13); não houve correlação entre a expressão da MyoD e a concentração sérica de TNF- α .

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Gene	Nº de acesso	Seqüência	Posição	Produto da PCR (bp)
MyoD	NM_176079.1	5'- GCCTGAGCAAAGTGAACGAG	572	229
		3'- TCTGAGTCGCCGCTGTAGT	800	
Miogenina	NM_017115.2	5'- TGCCACAAGCCAGACTACCCACC	828	245
		3'- CGGGGCACTCACTGTCTCTCAA	1072	
MRF4	NM_013172.1	5'-AGAGGCTGCCCAAGGTGGAGATTC	471	272
		3'- AAGACTGCTGGAGGCTGAAGCATC	742	
Ciclofilina	NM_017101.1	5'- ACGCCGCTGTCTCTTTTC	6	438
		3'- TGCCTTCTTTCACCTTCC	443	

Nº de acesso: número de acesso da seqüência de referência do gene no Gene Bank; Posição: localização do produto da PCR na seqüência de referência; Produto da PCR: tamanho do produto amplificado na reação em cadeia da polimerase, em pares de bases (bp).

Tabela 2. Parâmetros corporais dos animais

Variáveis	Sham (n=9)	IM/IC- (n=11)	IM/IC+ (n=11)	Valor de p (ANOVA)
PC (g)	542 ± 75	510 ± 59	452 ± 54*	0,010
VE (g)	1,022 ± 0,119	1,115 ± 0,213	0,988 ± 0,120	0,175
VD (g)	0,278 ± 0,041	0,294 ± 0,053	0,476 ± 0,107*#	<0,001
Átrios (g)	0,129 ± 0,031	0,162 ± 0,051	0,292 ± 0,057*#	<0,001
VE/PC (mg/g)	1,912 ± 0,159	2,137 ± 0,225	2,210 ± 0,363*	0,043
VD/PC (mg/g)	0,513 ± 0,032	0,575 ± 0,069	1,054 ± 0,210*#	<0,001
Átrios/PC (mg/g)	0,240 ± 0,032	0,321 ± 0,087	0,635 ± 0,141*#	<0,001
VD úmido/seco	4,176 ± 0,147	4,080 ± 0,205	4,159 ± 0,098	0,344
Pulmão úmido/seco	4,782 ± 0,209	4,667 ± 0,232	4,981 ± 0,195*	0,006
Fígado úmido/seco	3,020 ± 0,158	3,143 ± 0,094	3,294 ± 0,172*	<0,001
Sóleo (g)	0,250 ± 0,042	0,266 ± 0,058	0,241 ± 0,041	0,488
Sóleo/PC (mg/g)	0,461 ± 0,048	0,523 ± 0,083	0,535 ± 0,081	0,078

IM/IC-: animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs IM/IC-.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração.

Variáveis	Sham (n=9)	IM/IC- (n=11)	IM/IC+ (n=9)	Valor de p (ANOVA)
DDVE (mm)	8,33 ± 0,58	10,41 ± 0,62*	11,49 ± 0,81*#	<0,001
DDVE/PC (mm/kg)	15,55 ± 1,44	20,84 ± 2,42*	24,61 ± 2,98*#	<0,001
DSVE (mm)	4,12 ± 0,45	7,65 ± 0,93*	8,97 ± 1,00*#	<0,001
EDPP (mm)	1,63 ± 0,08	1,60 ± 0,12	1,81 ± 0,31	0,055
EDSIV (mm)	1,68 ± 0,08	1,63 ± 0,24	1,77 ± 0,29	0,368
AO (mm)	4,0 ± 0,2	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,2	0,135
AE (mm)	5,6 ± 0,3	7,1 ± 1,1*	9,1 ± 1,3*#	<0,001
AE/AO	1,39 ± 0,05	1,82 ± 0,35*	2,44 ± 0,43*#	<0,001
AE/PC (mm/kg)	10,46 ± 1,43	14,20 ± 2,66*	19,45 ± 2,99*#	<0,001

IM/IC-: animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e 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; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs IM/IC-.

Tabela 4. Avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	Sham (n=9)	IM/IC- (n=11)	IM/IC+ (n=9)	Valor de <i>p</i> (ANOVA)
FC (bpm)	276 ± 32	304 ± 28	310 ± 69	0,248
ΔD (%)	50,6 ± 3,2	26,6 ± 6,3*	22,1 ± 4,9*	<0,001
VEPP (mm/s)	36,5 ± 4,4	28,9 ± 6,1*	22,8 ± 3,1*#	<0,001
Onda E (cm/s)	73,7 ± 9,2	78,6 ± 18,4	116,1 ± 22,1*# (8)	<0,001
Onda A (cm/s)	46,1 ± 8,8	75,3 ± 19,4*	25,0 ± 12,1*# (4)	<0,001
E/A	1,63 ± 0,25	1,09 ± 0,38	5,48 ± 2,42*# (4)	<0,001
TDE (ms)	56,9 ± 11,4	47,3 ± 25,3	30,4 ± 10,3* (8)	0,005
TRIV (ms)	24,0 ± 5,6	34,6 ± 6,4*	25,5 ± 9,6# (8)	0,006

IM/IC-: animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e 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 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; números entre parênteses indicam número de ratos nos quais a variável pôde ser mensurada. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs IM/IC-.

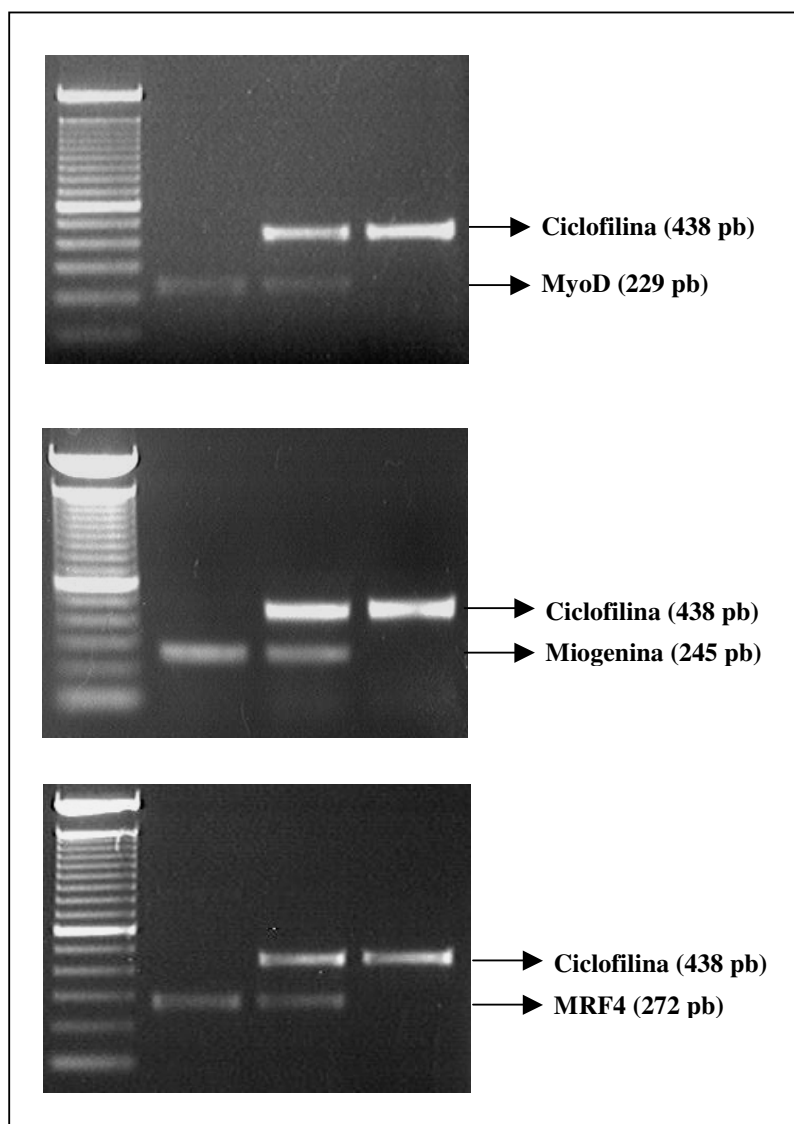


Figura 1. Amplificação simultânea do gene alvo e da ciclofilina (duplex). Visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

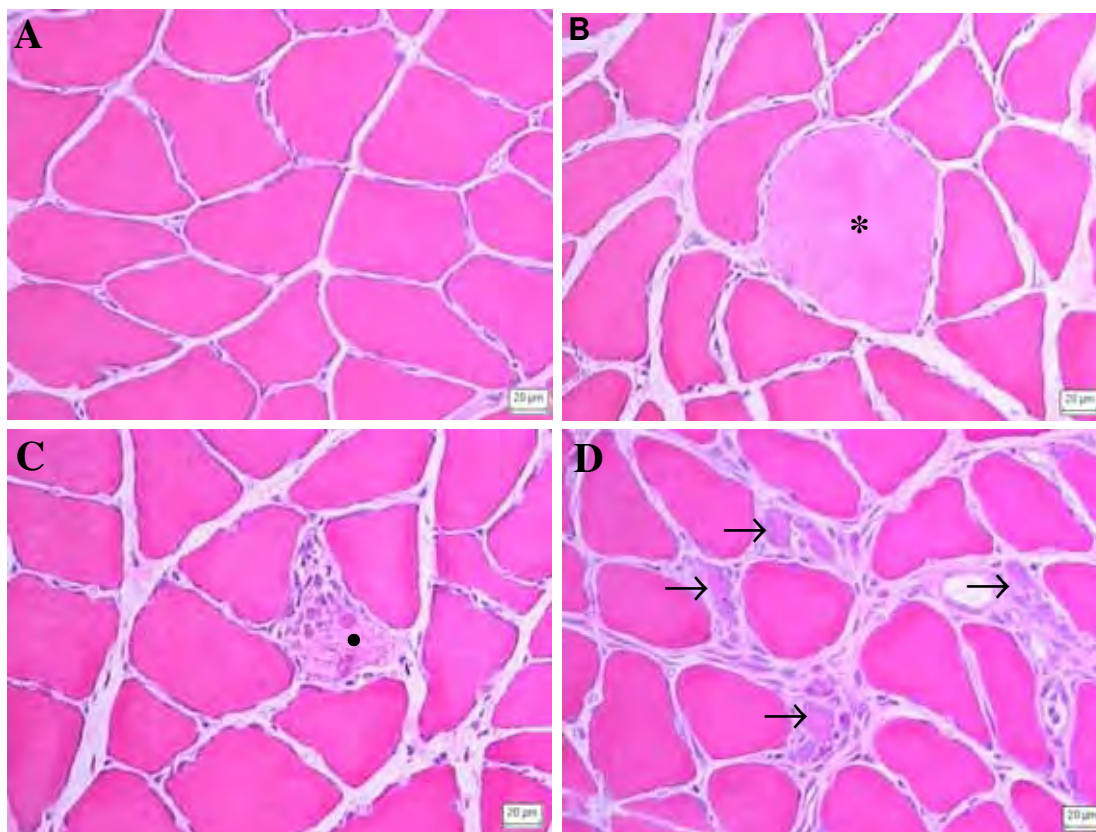


Figura 2. Cortes histológicos do músculo sóleo corados com hematoxilina-eosina. A) Grupo Sham (n=9): fibras musculares normais. B e C) Grupo IM/IC- (n=9): presença de fibras grandes, arredondadas e acidófilas (*); áreas focais e esparsas com necrose celular, acompanhada de infiltrado inflamatório e fagocitose (•). D) Grupo IM/IC+ (n=9): áreas de necrose foram observadas mais freqüentemente envolvendo grupamentos maiores de fibras musculares (→), com infiltrado de células inflamatórias e fagocitose.

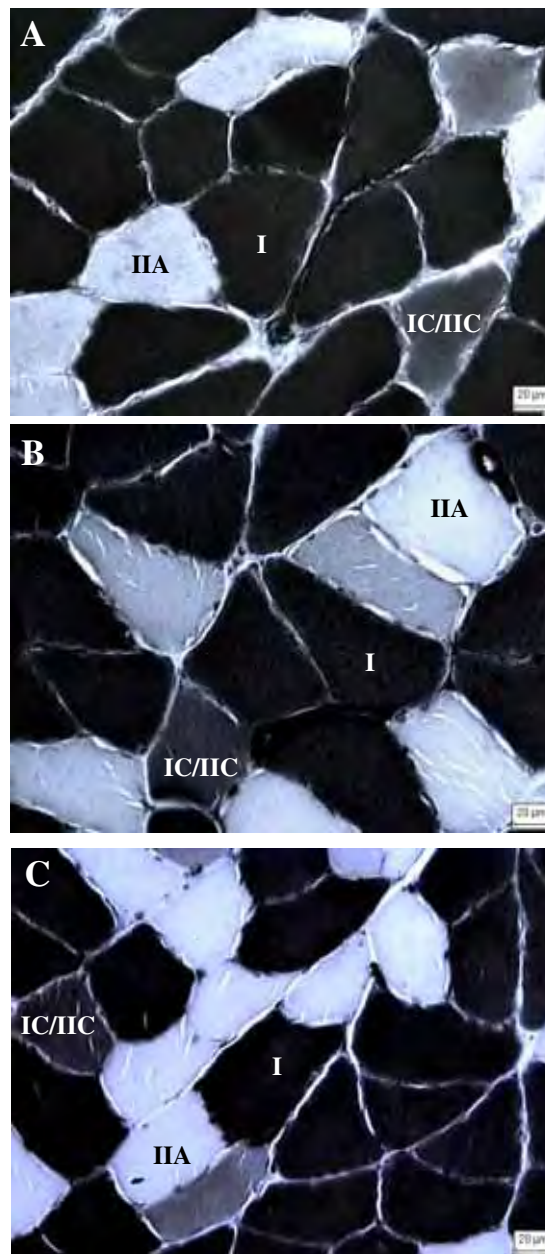


Figura 3. Cortes histológicos do músculo sóleo corados pela técnica de ATPase miofibrilar (pré-incubação em pH 4,32). As fibras musculares foram classificadas como tipo I, IC/IIC ou IIA. A) Grupo Sham (n=9); B) Grupo IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; C) Grupo IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca.

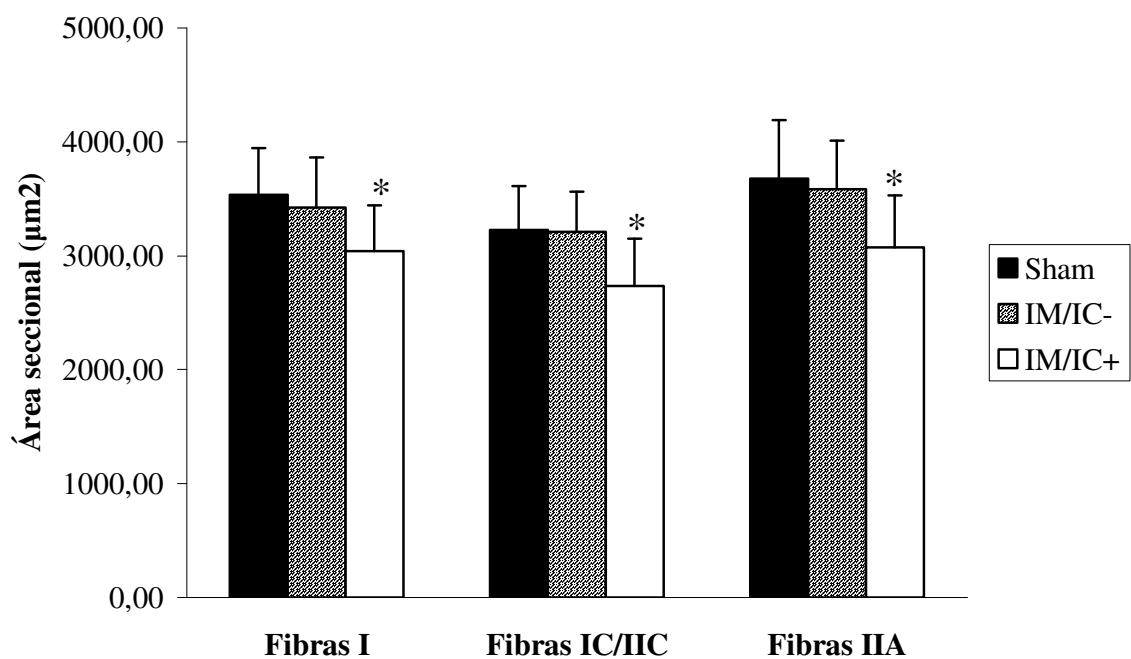


Figura 4. Área seccional transversa das fibras I, IC/IIC e IIA do músculo sóleo. Sham (n=9); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA e Tukey. *p<0,05 versus Sham.

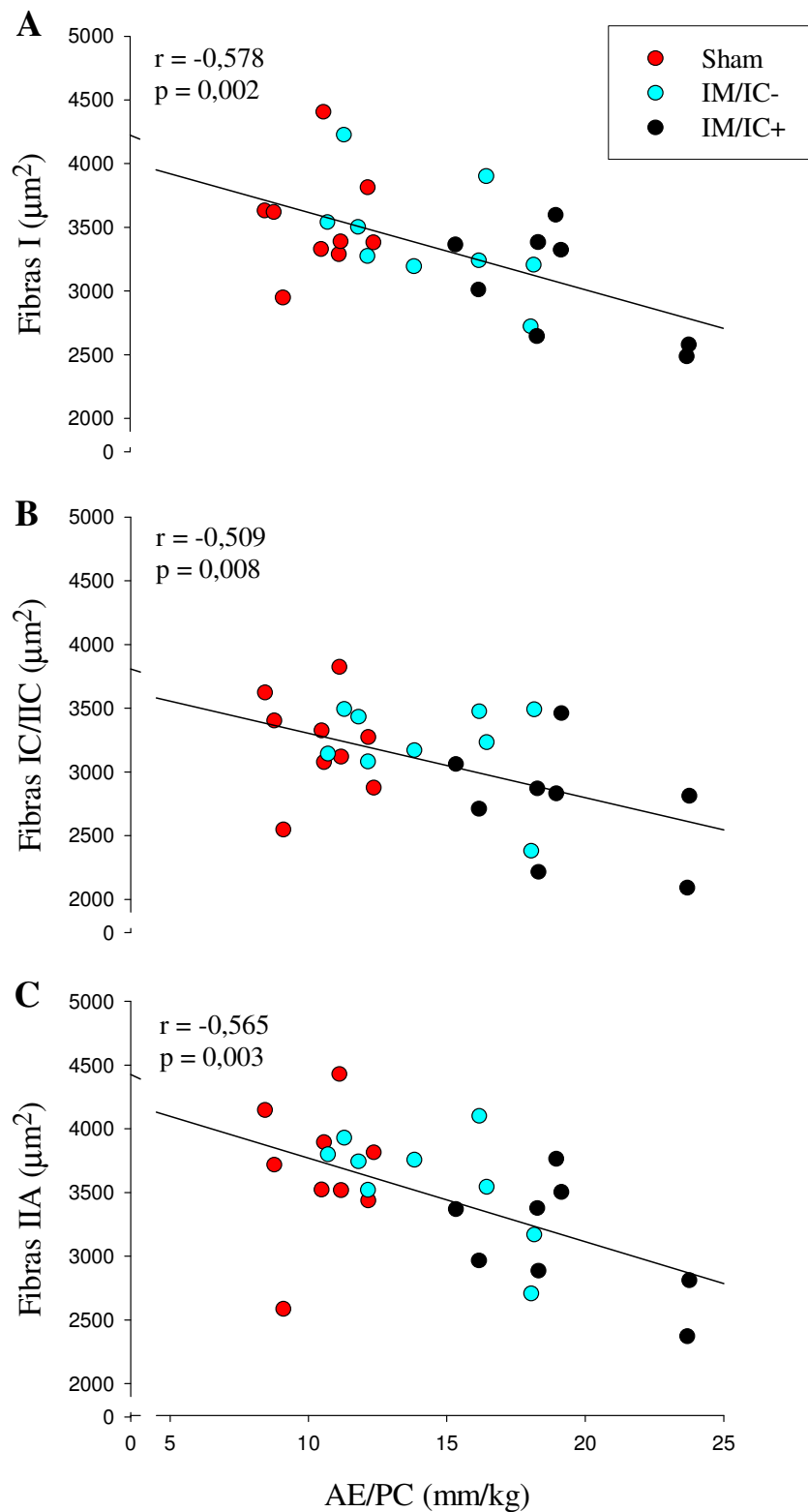


Figura 5. Diagrama de dispersão entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC) e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson.

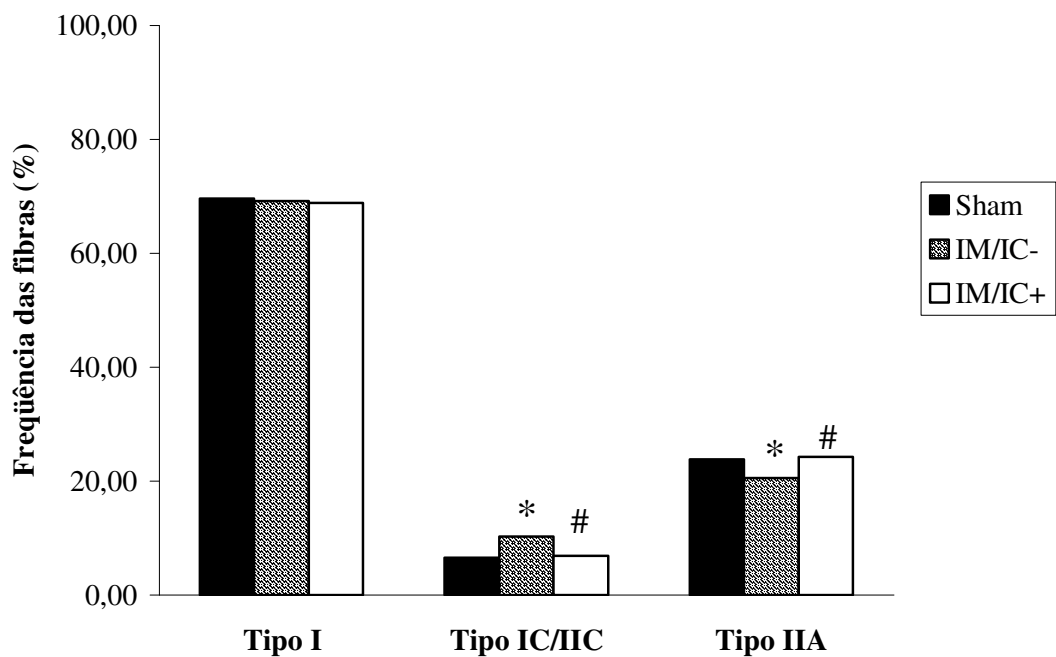


Figura 6. Distribuição de freqüência das fibras I, IC/IIC e IIA do músculo sóleo. IM/IC-: animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+: animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste de Goodman. * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus IM/IC-.

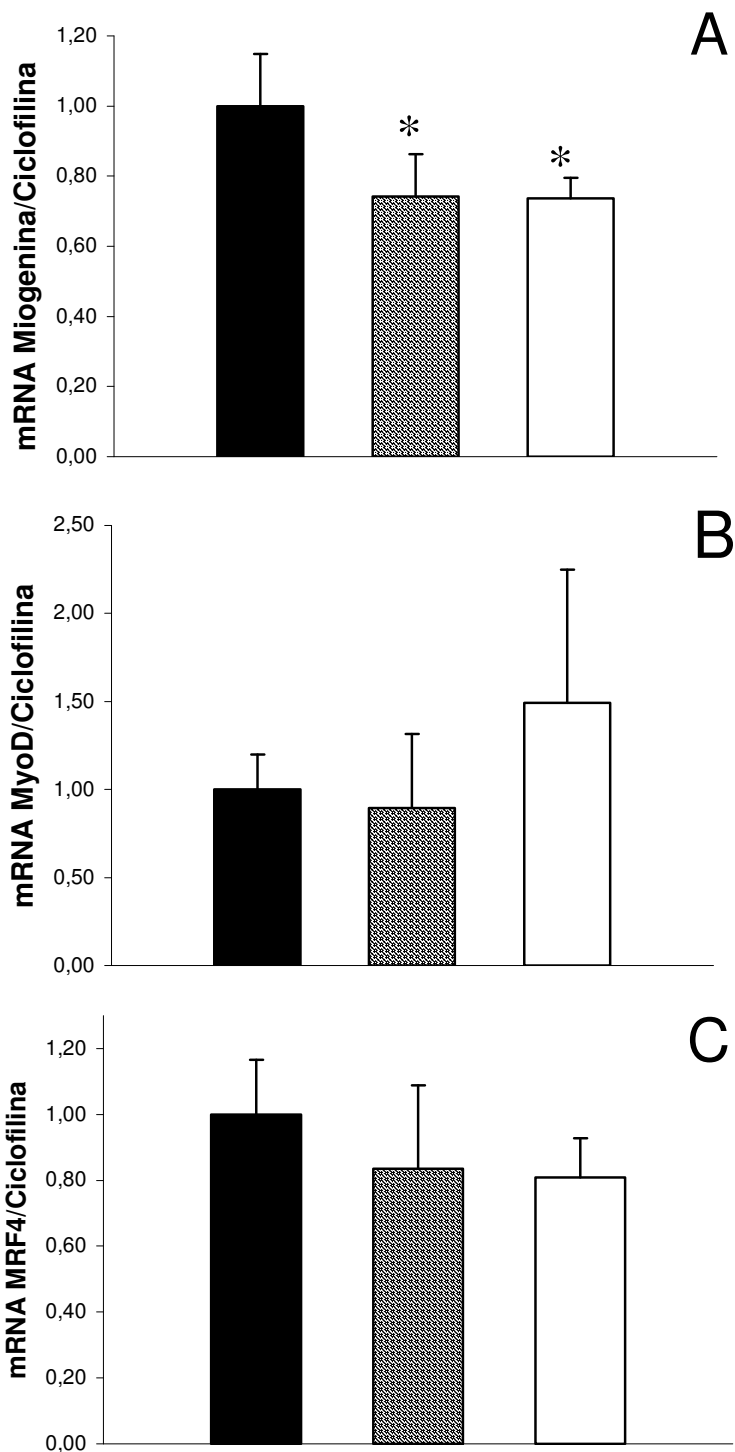


Figura 7. Expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MRF) no músculo sóleo analisada por meio da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). A expressão gênica dos MRF foi normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Sham (n=9); IM/IC- (n=7): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=6): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados normalizados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA e Tukey. * $p < 0,05$ versus Sham.

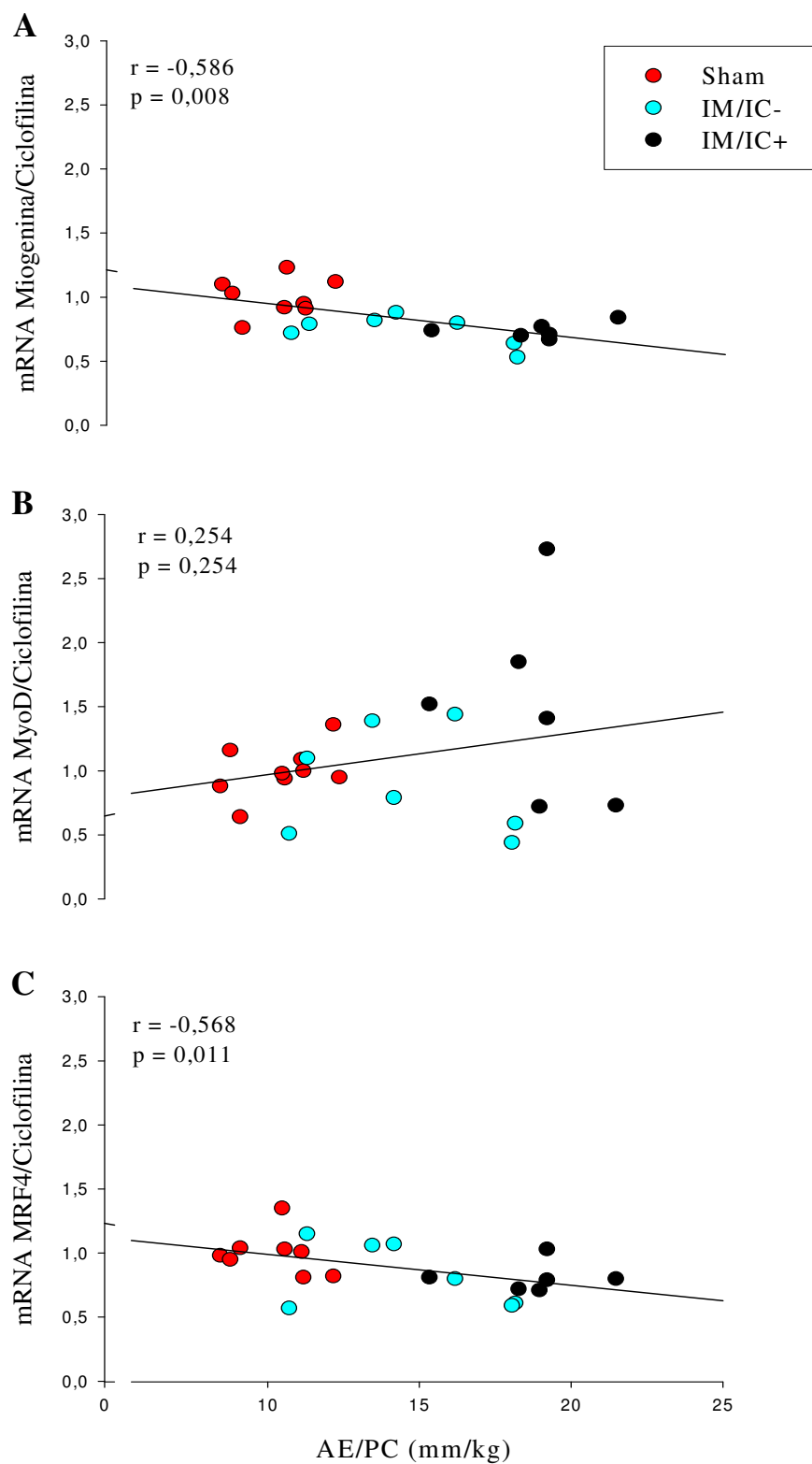


Figura 8. Diagrama de dispersão entre o diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC) e a expressão dos fatores de regulação miogênica miogenina (em A), MyoD (em B) e MRF4 (em C); correlação de Pearson.

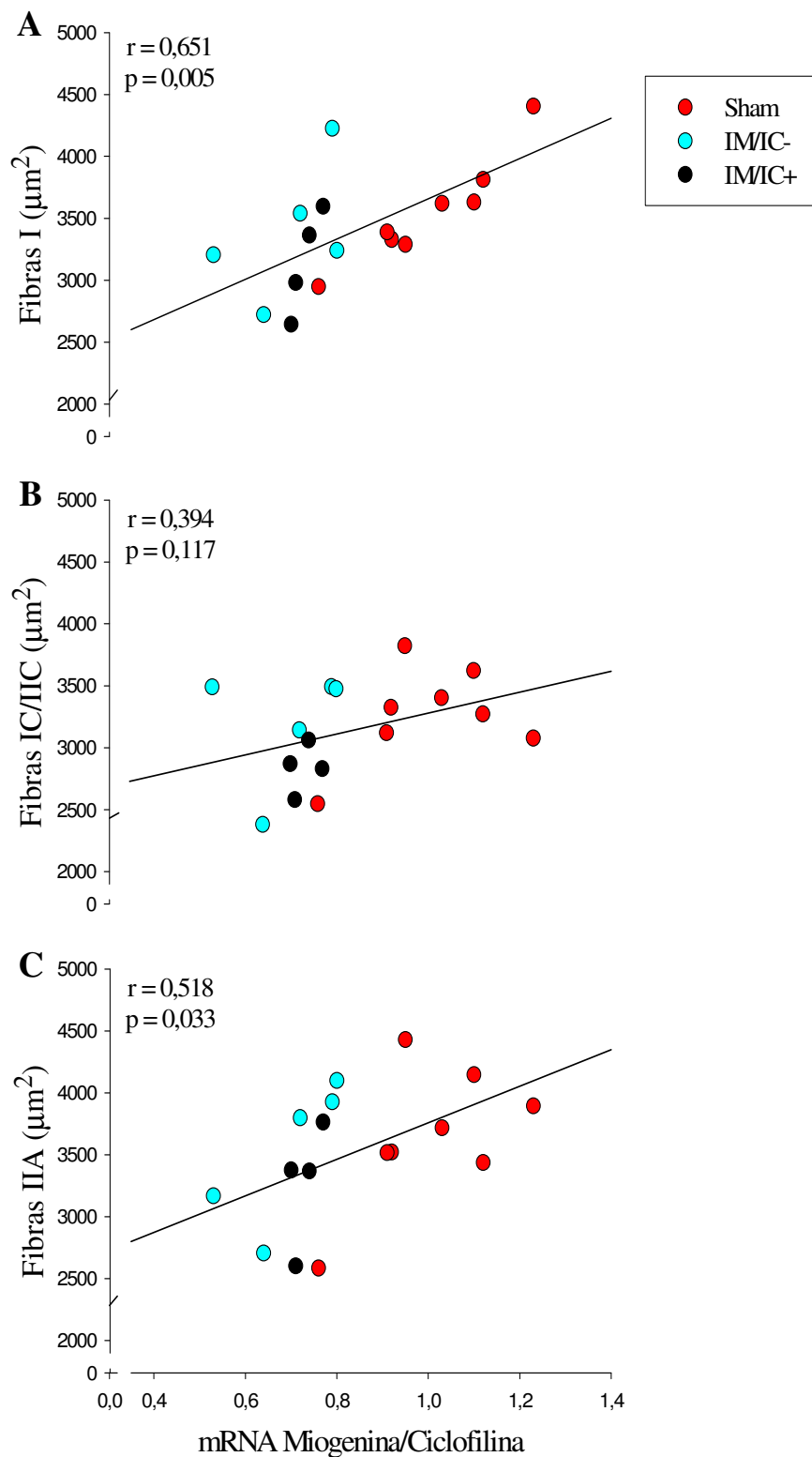


Figura 9. Diagrama de dispersão entre a expressão de miogenina e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson.

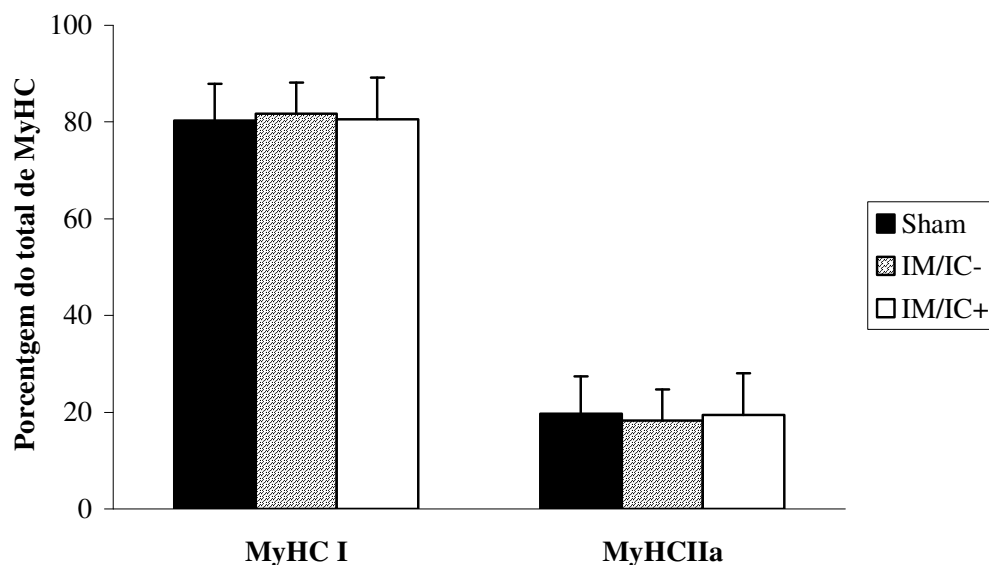


Figura 10. Distribuição das isoformas das cadeias pesadas de miosina (MyHC) no músculo sóleo analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio. A quantidade de cada isoforma de MyHC foi expressa em relação à quantidade total de MyHC. Sham (n=9); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=9): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA.

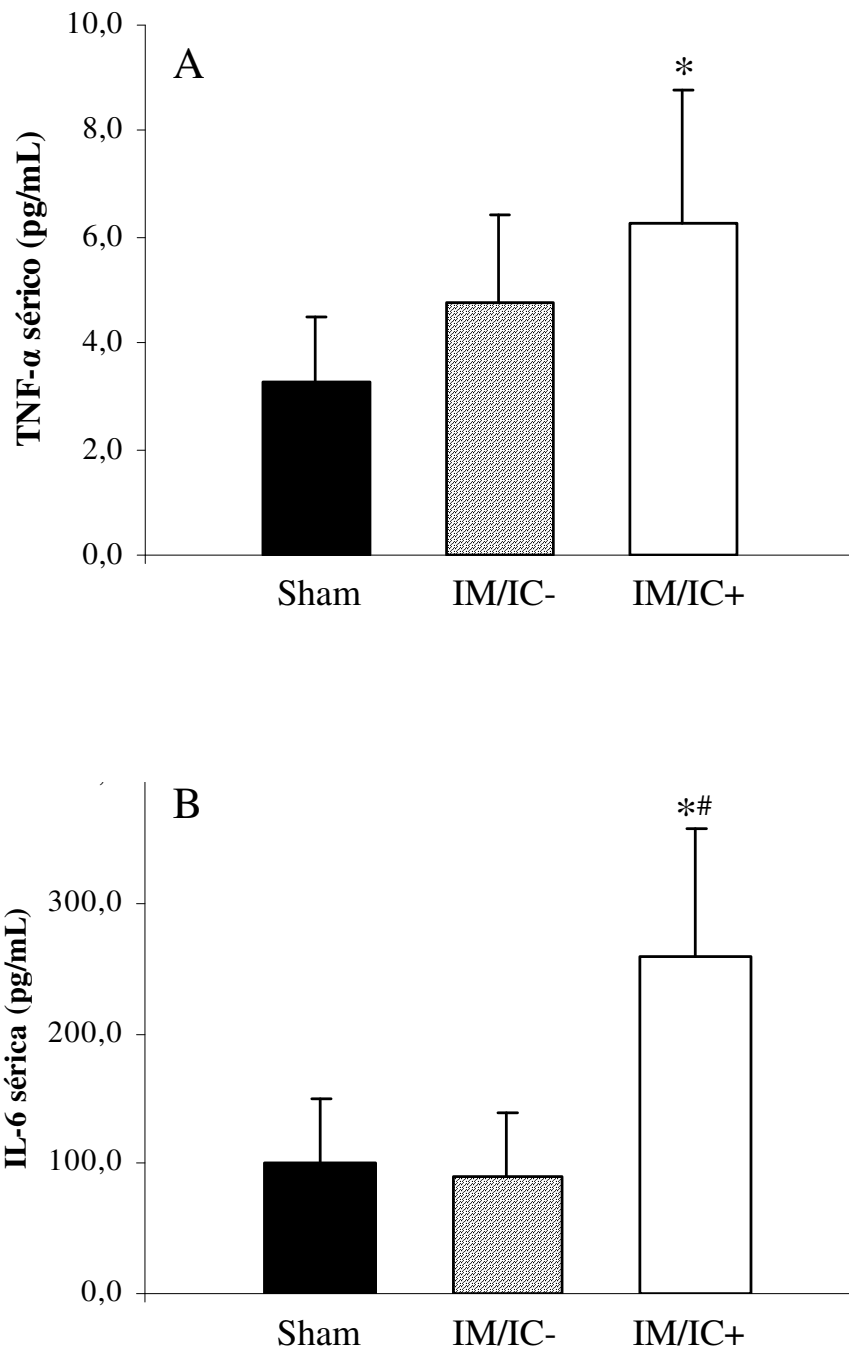


Figura 11. Concentração sérica de TNF- α (A) e interleucina-6 (B). A dosagem das citocinas foi realizada por ELISA. Sham (n=8); IM/IC- (n=9): animais com infarto do miocárdio e disfunção ventricular esquerda sem insuficiência cardíaca; IM/IC+ (n=11): animais com infarto do miocárdio, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA e Tukey.*p<0,05 versus Sham; #p<0,05 versus IM/IC-.

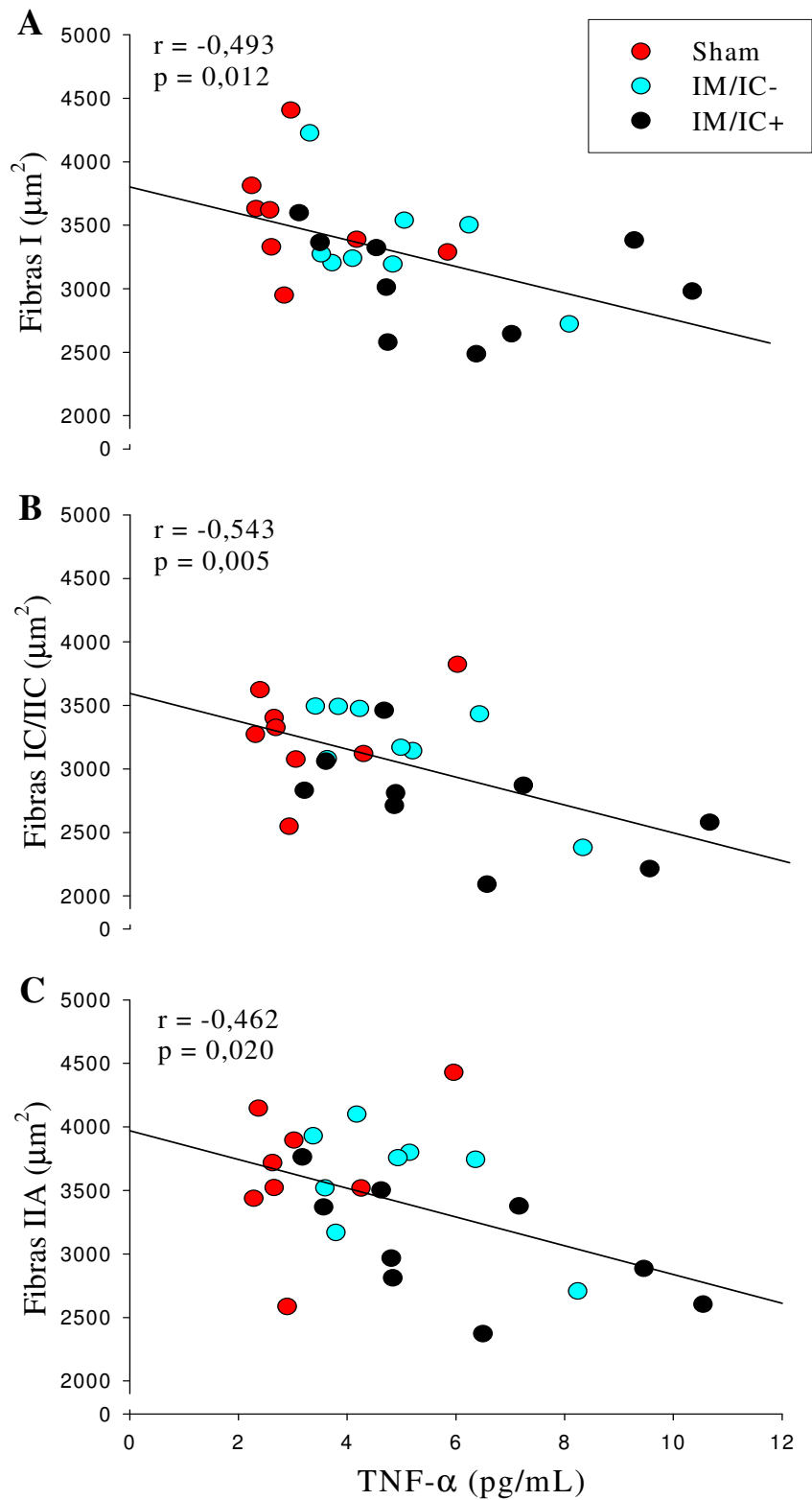


Figura 12. Diagrama de dispersão entre a concentração sérica de TNF- α e a área seccional das fibras I (em A), IC/IIC (em B) e IIA (em C); correlação de Pearson.

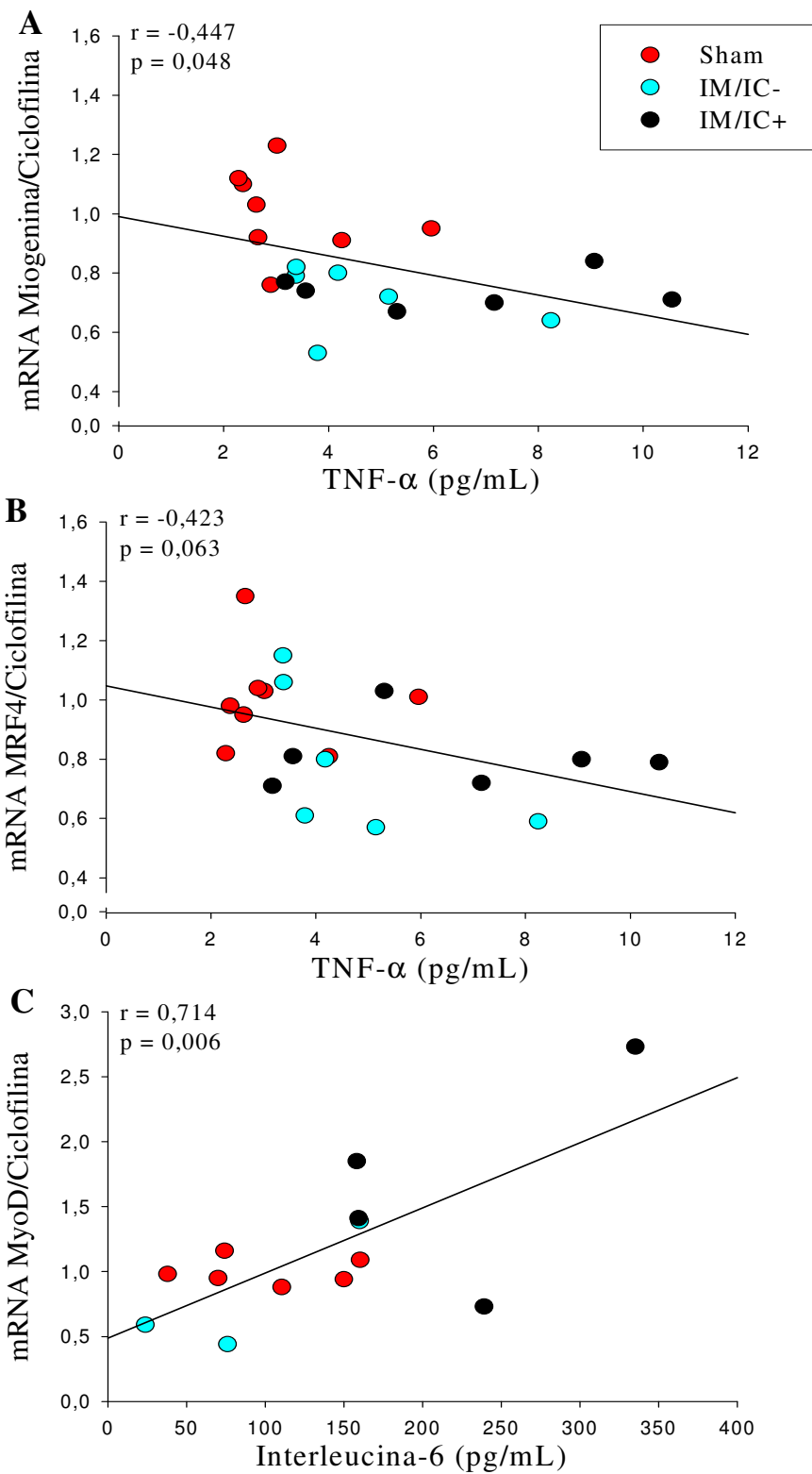


Figura 13. Diagrama de dispersão entre a concentração de citocinas circulantes e a expressão dos fatores de regulação miogênica; correlação de Pearson.

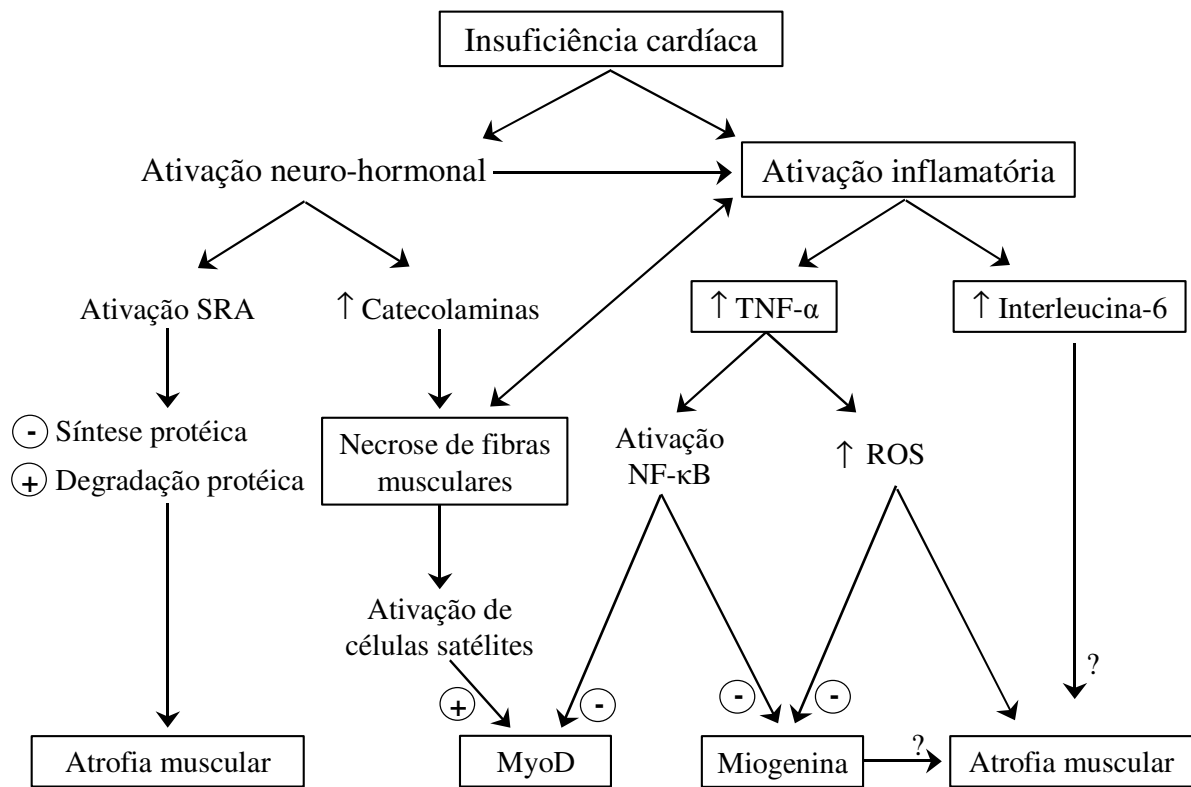


Figura 14. Representação esquemática de hipótese para justificar os achados deste estudo. +: estimula; -: inibe; ROS: espécies reativas de oxigênio; SRA: sistema renina-angiotensina; NF-κB: fator nuclear kapa B.

5. DISCUSSÃO

Nestes estudo avaliamos o trofismo muscular, a composição das cadeias pesadas de miosina e, pela primeira vez na literatura, a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos com disfunção ventricular, sem insuficiência cardíaca e com insuficiência cardíaca crônica. Adicionalmente, mostramos, também pela primeira vez, que o desenvolvimento de insuficiência cardíaca é acompanhado por necrose de fibras musculares esqueléticas.

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 freqüentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subseqüentes ^{79,80}. Além disso, cursa com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, semelhantemente ao que se observa em humanos.

O diagnóstico da insuficiência foi baseado na observação de sinais clínico e/ou anátomo-patológicos avaliados *in vivo*, como taquipnéia/dispnéia, ou *post mortem*, como ascite, derrame pleuropericárdico, congestão hepática, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito ^{61,64,81,82}. Como não há critérios estabelecidos na literatura sobre quantos sinais devem estar presentes para que ratos sejam considerados portadores de insuficiência cardíaca, definimos como insuficientes os animais que apresentassem dois ou mais sinais clínico e/ou anátomo-patológicos ⁶⁵. 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, pode ser o melhor parâmetro para selecionar animais com insuficiência cardíaca ^{81,83-85}. Considera-se que a hipertrofia ventricular direita é decorrente de hipertensão pulmonar resultante de aumento da pressão de enchimento do átrio esquerdo ⁸¹. Em nosso estudo, todos os animais do grupo IM/IC+ tiveram hipertrofia do ventrículo direito.

Embora a variável peso corporal não tenha sido utilizada para definir os grupos, os ratos com insuficiência cardíaca apresentaram peso corporal

estatisticamente menor que os grupos Sham e IM/IC-. Em humanos, a redução do peso corporal que acompanha o desenvolvimento de insuficiência cardíaca grave é denominada de caquexia cardíaca e constitui importante preditor de mortalidade^{86,87}. Em ratos, o quadro de caquexia cardíaca foi bem caracterizado no modelo de insuficiência cardíaca induzida por estenose de aorta ascendente⁸⁸. Finalmente, a relação peso úmido/peso seco do pulmão e fígado, maior no grupo IM/IC+ que no Sham, mostra a presença de congestão pulmonar e sistêmica nos animais com insuficiência cardíaca.

Como se sabe, o tamanho do infarto do miocárdio é fator determinante para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-infarto, tanto em humanos como em animais de experimentação. Assim, a maior porcentagem de área infartada no grupo IM/IC+ justifica o aparecimento da síndrome de insuficiência cardíaca nestes animais.

Para caracterizar a presença de disfunção ventricular no grupo IM/IC-, 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 acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparado ao grupo Sham. E, como esperado, o comprometimento do coração causado pelo infarto do miocárdio foi menor no grupo IM/IC- do que no grupo IM/IC+. Por exemplo, o grau de dilatação das câmaras cardíacas esquerdas, ventrículo esquerdo (diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, absoluto ou normalizado para o peso corporal) e átrio esquerdo (diâmetro do átrio esquerdo, absoluto ou normalizado para o diâmetro da aorta ou o peso corporal), foi maior no grupo IM/IC+ que no grupo IM/IC-. Da mesma forma, os índices de função sistólica porcentagem de encurtamento endocárdico e velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo foram reduzidos nos dois grupos infartados, porém mais intensamente no grupo IM/IC+. Em relação à avaliação da função diastólica, o grupo IM/IC- foi também caracterizado por grau menos intenso de disfunção que o IM/IC+, apresentando aumento dos valores da onda A e do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) em comparação ao Sham. O grupo IM/IC+ apresentou alteração de todos os índices de função diastólica

avaliados em relação ao grupo Sham e/ou ao IM/IC-. É importante ressaltar que, no grupo IM/IC+, os valores normais do TRIV, juntamente com o aumento estatisticamente significativo do índice E/A e a redução do tempo de desaceleração da onda E mitral, indicam grau mais grave de disfunção diastólica.

A relação entre o diâmetro do átrio esquerdo e o peso corporal (AE/PC) é facilmente mensurável em ratos infartados, aumenta progressivamente com a piora da função ventricular e, portanto, é considerada um bom índice para avaliar as propriedades sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo ⁸⁹. 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 ⁸⁹. Assim, a relação AE/PC foi utilizada como marcador de gravidade da função ventricular nas correlações com as diversas variáveis analisadas neste estudo.

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo sóleo porque estudos prévios de nosso grupo mostraram que este músculo é sensível às alterações induzidas pela insuficiência cardíaca aguda ^{20,76} ou crônica ³⁸. Neste trabalho, não foi detectada alteração do peso do músculo sóleo, absoluto ou normalizado para o peso corporal. É provável que o edema decorrente da insuficiência cardíaca e a presença de células inflamatórias e de fibrose no sóleo possam ter colaborado para a manutenção do peso do músculo. De fato, à análise morfológica, a área seccional das fibras musculares foi reduzida nos ratos do grupo IM/IC+. Para avaliar a área das fibras de contração rápida e lenta, separadamente, utilizamos a técnica ATPase miofibrilar após pré-incubação ácida, que cora diferentemente as fibras, de acordo com a atividade ATPásica da miosina. Os ratos com insuficiência cardíaca apresentaram redução da área seccional das fibras dos tipos I, IC/IIC e IIA quando comparados aos do Sham. O grupo IM/IC- teve comportamento intermediário entre os grupos Sham e IM/IC+, apresentando as áreas das fibras musculares estatisticamente semelhantes aos dois grupos. A correlação entre as áreas das fibras dos três grupos e a variável AE/PC mostra que a piora da função ventricular é acompanhada por atrofia das fibras musculares.

Além da redução da área seccional das fibras musculares, encontramos importantes alterações histológicas à microscopia óptica no músculo sóleo dos animais infartados. No grupo IM/IC-, as alterações foram caracterizadas por áreas focais e esparsas de necrose de fibras isoladas ou de grupamento de fibras e áreas com substituição das fibras em necrose por células inflamatórias e processo de fagocitose. No grupo IM/IC+, em 50% dos animais analisados, as áreas de necrose eram maiores, mais freqüentemente distribuídas e acompanhadas por infiltrado inflamatório, fagocitose e substituição celular por tecido fibroso. Embora apoptose venha sendo freqüentemente descrita em músculos de pacientes ³⁵ ou de animais ^{29,90} com insuficiência cardíaca crônica, não encontramos relatos sobre a presença de necrose de miócitos em músculos esqueléticos em situações de insuficiência cardíaca.

Nossos resultados mostram que alterações musculares periféricas podem ocorrer precocemente nos animais com agressão cardíaca, antes mesmo do desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Assim, o grupo IM/IC- apresentou alteração na distribuição dos tipos de fibras, com aumento na proporção de fibras híbridas, IC/IIC, e redução nas proporção de fibras rápidas, IIa. Além disso, teve comportamento intermerdiário em relação à área de suas fibras lentas, que foram semelhantes aos grupos Sham e IM/IC+, e apresentou áreas focais e esparsas de necrose de miócitos isolados.

Os mecanismos responsáveis pelas alterações histológicas da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca não estão definidos. Atrofia muscular tem sido comumente observada tanto em estudos clínicos ^{12,16,91} como em trabalhos experimentais ^{30,38,47,92}. Alguns fatores parecem estar envolvidos na indução de atrofia muscular como redução da atividade física e neuromuscular e ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanha o desenvolvimento da insuficiência cardíaca ^{24,25,27-32,93}.

Foi inesperado o achado de necrose de fibras do músculo esquelético em ambos os grupos de ratos infartados. A presença de necrose em nosso material vem de encontro à hipótese de que, após a ocorrência de agressão cardíaca, os mesmos fatores que agridem o miocárdio e levam ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca podem também ser responsáveis por

alterações da musculatura esquelética ⁹⁴. Em ratos com hipertensão renovascular, observamos alterações miocárdicas semelhantes às encontradas no músculo sóleo. Inicialmente, verificamos necrose de miócitos cardíacos isolados e, posteriormente, detectamos áreas maiores de necrose com substituição dos miócitos por tecido fibroso ⁹⁵. Entre os principais candidatos a fatores agressores das fibras musculares, cardíacas ou periféricas, encontram-se a ativação sistêmica de sistemas neurohormonais e a ativação inflamatória que acompanham o desenvolvimento da insuficiência cardíaca ^{22,25,94,96}. De fato, Dalla Libera et al. ²² observaram que, durante a insuficiência cardíaca, o bloqueio do receptor da angiotensina II com conseqüente atenuação do aumento dos níveis de TNF- α previne o desenvolvimento de atrofia, apoptose e alterações na distribuição das MyHC.

Neste estudo, ao contrário do que esperávamos, não observamos alterações na distribuição das isoformas de MyHC no músculo sóleo dos animais com insuficiência cardíaca. A modificação do padrão das cadeias pesadas de miosina, em direção ao aumento das isoformas rápidas, tem sido observada repetidas vezes na insuficiência cardíaca ^{36,38,97,98}. Entretanto, outros autores também não detectaram alterações na composição das miosinas no músculo sóleo de animais insuficientes ^{37,76,99}. Além disso, a alteração das miosinas na insuficiência cardíaca pode não ocorrer uniformemente em todos os músculos esqueléticos. Por exemplo, Spangenburg et al. ³⁷ avaliaram vários músculos de ratos com infarto do miocárdio e verificaram que as alterações na distribuição das isoformas de MyHC estavam presentes em músculos mistos, mas ausentes no sóleo, um músculo lento.

À avaliação da expressão gênica dos MRFs no músculo sóleo, verificamos redução estatisticamente significativa da expressão gênica da miogenina em ambos os grupo IM/IC- e IM/IC+, tendência para aumento na expressão da MyoD e manutenção da expressão do MRF4. Foi interessante notar a correlação negativa entre a expressão da miogenina ou do MRF4 e a relação AE/PC, mostrando o papel da insuficiência cardíaca em alterar os MRFs.

O MRF4 é predominantemente expresso em fibras lentas, oxidativas, e parece desempenhar papel importante na regulação do trofismo muscular. De

fato, a redução dos níveis de mRNA para MRF4 foi associada a atrofia por desuso⁵³. Também em modelo experimental de insuficiência cardíaca aguda, a diminuição da expressão gênica do MRF4 foi associada a atrofia do músculo sóleo⁷⁶. No presente estudo, embora as fibras do músculo sóleo do grupo IM/IC+ tenham apresentado redução da área seccional transversa, não detectamos alteração na expressão gênica do MRF4. Considerando que observamos correlação negativa entre a expressão do MRF4 e a relação AE/PC e que não avaliamos os níveis protéicos de MRF4 no músculo, não é possível descartar que este fator participe do processo de atrofia muscular. Entretanto, outros mecanismos como aumento da miostatina¹⁰⁰⁻¹⁰², ativação inflamatória, particularmente elevação do TNF- α ²⁵, e ativação do sistema ubiquitina-proteossoma¹⁰³ podem estar envolvidos na indução de atrofia da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca.

Neste estudo, verificamos redução dos níveis de mRNA para miogenina em ambos os grupos infartados, IM/IC- e IM/IC+. Em estudos com diversos modelos experimentais, foi verificado que aumento do estresse oxidativo e elevação do TNF- α podem levar à redução da miogenina⁵⁸. O TNF- α pode inibir a expressão de miogenina tanto por estímulo da via que leva à ativação do fator nuclear-kappaB (NF- κ B) como por aumento do estresse oxidativo⁵⁹.

A miogenina encontra-se freqüentemente associada à expressão de enzimas oxidativas e parece ter papel fundamental na caracterização do metabolismo muscular^{104,105}. Além disso, está envolvida no processo de diferenciação de células satélites e formação de miotubos⁵⁴. Apesar de não termos analisado parâmetros metabólicos, a expressão reduzida da miogenina nos grupos infartados e a correlação positiva entre miogenina e área seccional das fibras I sugerem que este MRF modula o metabolismo oxidativo na insuficiência cardíaca. Embora com fisiopatogenia ainda não definida, a redução do metabolismo oxidativo muscular tem sido freqüentemente descrita na insuficiência cardíaca^{91,98,106-108}.

A redução da miogenina foi acompanhada por necrose de fibras musculares em ambos os grupos infartados, IM/IC- e IM/IC+, e a atrofia das fibras no grupo IM/IC+. A diminuição da miogenina parece prejudicar a

diferenciação miogênica que ocorre como parte do processo regenerativo do músculo em resposta a uma agressão, contribuindo para o desenvolvimento de atrofia muscular⁵⁹. Neste estudo, apesar da miogenina estar reduzida em ambos os grupos com disfunção ventricular, e atrofia ter sido encontrada apenas no grupo IM/IC+, não podemos descartar que a redução da expressão gênica da miogenina possa ter colaborado na atrofia muscular. O fato da miogenina estar reduzida também no grupo IM/IC- sugere, mais uma vez, que as modificações da musculatura esquelética estão associadas a alterações de sistemas neurohormonais e/ou a ativação inflamatória sistêmica e podem preceder o desenvolvimento da síndrome da insuficiência cardíaca.

Em nosso estudo, houve tendência para o aumento da expressão da MyoD. Situações em que há proliferação de células satélites são caracterizadas por elevados níveis de MyoD. Em nosso estudo, é possível que a necrose e/ou a atrofia muscular tenham levado à ativação de células satélites e que a expressão aumentada de MyoD seja um indicador de proliferação destas células. Sabe-se que o TNF- α pode induzir redução da expressão da MyoD via ativação de NF- κ B¹⁰⁹. Como o TNF- α foi elevado no grupo IM/IC+, poderíamos esperar redução da expressão gênica da MyoD nesse grupo. Assim, nossos dados sugerem que os estímulos decorrentes de necrose e/ou atrofia muscular para aumentar a expressão gênica da MyoD predominam sobre o estímulo pela via NF- κ B para reduzir sua expressão. É possível, ainda, que os mesmos fatores que induzem necrose e/ou atrofia sejam responsáveis pelo aumento da expressão da MyoD.

Os animais com insuficiência cardíaca apresentaram concentrações séricas de TNF- α e interleucina-6 significativamente elevadas em relação ao grupo Sham. O grupo IM/IC- apresentou comportamento intermediário em relação aos valores da concentração sérica de TNF- α , sendo estatisticamente semelhante aos grupos Sham e IM/IC+. Durante o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, ocorre aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucina-6⁹³. Estudos clínicos^{25,35} e experimentais^{28,90} verificaram níveis circulantes elevados de TNF- α ^{29,35,90} e de interleucina-6^{25,28} associados à atrofia ou apoptose muscular. Interessantemente, mostramos que a ativação inflamatória foi acompanhada por atrofia e necrose de fibras musculares e a concentração sérica de TNF- α foi

correlacionada negativamente com a área dos três tipos de fibras analisadas. Embora o mecanismo de ação das citocinas nas alterações musculares associadas à insuficiência cardíaca ainda não esteja esclarecido, há evidências que o TNF- α estimula o sistema das caspases ²² e a via ubiquitina-proteossoma ⁵⁹ e tenha papel direto no comprometimento da musculatura esquelética. Além disso, por meio da ativação da via ubiquitina-proteossoma e de aumento de espécies reativas de oxigênio, o TNF- α pode levar à redução da expressão de miogenina ⁵⁹. De fato, observamos correlação negativa entre a concentração sérica de TNF- α e a expressão gênica de miogenina. Por outro lado, não se sabe se a interleucina-6 está envolvida nas alterações da musculatura ou se seu aumento reflete apenas um epifenômeno da síndrome da insuficiência cardíaca crônica.

Na figura 8, está apresentada, em diagrama, uma hipótese para explicar os achados de nosso trabalho. Na insuficiência cardíaca, há ativação neurohormonal e aumento das concentrações séricas de TNF- α e de interleucina-6. No músculo esquelético, a ativação do sistema renina-angiotensina induz apoptose ⁹⁶, redução da síntese protéica ¹¹⁰ e aumento da degradação de proteínas ¹¹¹, resultando em atrofia muscular. A ativação do sistema nervoso simpático, caracterizado pelo aumento de catecolaminas, leva a necrose de fibras musculares ¹¹². A necrose e o processo inflamatório levam à ativação de células satélites e ao aumento da expressão da MyoD. Por outro lado, o aumento do TNF- α ativa o NF- κ B e promove aumento das espécies reativas de oxigênio. A ativação do NF- κ B resulta em redução da expressão da MyoD e da miogenina. As espécies reativas de oxigênio também levam à diminuição da miogenina e, diretamente, induzem atrofia muscular. A redução da miogenina pode prejudicar a regeneração de fibras musculares e, indiretamente, colaborar no desenvolvimento de atrofia. Finalmente, o aumento da interleucina-6 está acompanhado por atrofia muscular. Como referido anteriormente, nossos dados sugerem que os estímulos decorrentes de necrose e/ou atrofia muscular para aumentar a expressão gênica da MyoD predominam sobre o estímulo pela via NF- κ B para reduzir sua expressão.

O resumo dos achados para o grupo IM/IC-, que apresenta disfunção ventricular sem insuficiência cardíaca, inclui alteração na distribuição das fibras, necrose de fibras musculares e redução da expressão da miogenina, e presença de comportamento intermediário entre os grupos Sham e IM/IC+ em relação a valores da área seccional das fibras e da concentração sérica de TNF- α . Estes dados sugerem que alterações da musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca iniciam-se precocemente, antes do aparecimento da síndrome clínica de insuficiência cardíaca.

Em conclusão, na insuficiência cardíaca crônica, a alteração dos fatores de regulação miogênica caracterizada por redução da expressão gênica da miogenina e tendência ao aumento da MyoD é acompanhada por atrofia e necrose de fibras do músculo esquelético sóleo. Alterações musculares como redução da expressão da miogenina e necrose de fibras iniciam-se precocemente durante o processo e podem ser observadas em ratos com disfunção ventricular sem insuficiência cardíaca.

7. RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) caracteriza-se por reduzida tolerância aos exercícios físicos com ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Recentemente tem sido sugerido que anormalidades da musculatura esquelética podem contribuir para a diminuição da capacidade física. Atrofia muscular e modificação na composição das cadeias pesadas das moléculas de miosinas (MyHC) têm sido freqüentemente observadas em trabalhos clínicos e experimentais. As causas das alterações musculares ainda não estão definidas. Ativação de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α e interleucina-6 (IL-6), pode estar envolvida nas alterações. Há evidências que os fatores de regulação miogênica (MRF) possam participar da miopatia associada à IC, uma vez que são fatores transcricionais que modulam a expressão de proteínas específicas do músculo incluindo as MyHCs. O objetivo deste estudo foi avaliar o trofismo, a composição das cadeias pesadas de miosina e a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos com disfunção ventricular, sem IC e com IC. Como o TNF- α e a IL-6 estão aumentados na IC e associados a alterações musculares, analisamos também suas concentrações séricas. Métodos: IC foi induzida por infarto do miocárdio. Seis meses após a cirurgia, foram constituídos três grupos de animais: sham (n=9), IM/IC- (animais infartados sem sinais de IC, n=11) e IM/IC+ (animais infartados com dois ou mais sinais de IC, n=11). Estrutura e função cardíacas foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico. A expressão dos MRF MyoD, miogenina e MRF4 foi analisada por RT-PCR no músculo sóleo. As isoformas de MyHC foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Análise histoquímica com ATPase miofibrilar foi utilizada para classificação dos tipos de fibras e mensuração da área seccional. A morfologia geral do músculo sóleo foi avaliada em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. A concentração sérica de TNF- α e IL-6 foi mensurada por ELISA. Resultados: No grupo IM/IC+, o tamanho do infarto foi maior que no IM/IC- (p=0,001). 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 pelo infarto foi maior no grupo IM/IC+ que no IM/IC-. No grupo Sham, as fibras musculares do músculo sóleo eram normais. No

grupo IM/IC-, foram observadas fibras grandes, arredondadas e acidófilas. Áreas focais com necrose de uma única fibra muscular ou de um grupo de fibras foram observadas em todos os animais. A necrose foi acompanhada por infiltrado de células inflamatórias e fagocitose da fibra. Essas alterações foram também verificadas nos animais do grupo IM/IC+; entretanto, em quatro dos nove ratos estudados, as áreas de necrose foram maiores e mais frequentes e acompanhadas de infiltrado inflamatório, fagocitose e áreas de substituição celular por tecido fibroso. O grupo IM/IC+ apresentou atrofia das fibras I, IC/IIC e IIA quando comparado ao Sham ($p < 0,05$). A expressão gênica da miogenina foi semelhante entre os grupos IM/IC- e IM/IC+ e significativamente diminuída em relação ao Sham ($p < 0,05$). Houve tendência para aumento da expressão de MyoD no grupo IM/IC+ ($p = 0,078$). A expressão do MRF4 e a distribuição das isoformas de MyHC não diferiram entre os grupos. O grupo IM/IC+ apresentou maior concentração sérica de TNF- α que o Sham ($p = 0,009$). Os níveis circulantes de IL-6 foram maiores em IM/IC+ que nos grupos Sham e IM/IC- ($p < 0,001$). Houve correlação negativa entre a área das fibras musculares e o diâmetro do átrio esquerdo/peso corporal. A concentração sérica de TNF- α correlacionou-se negativamente com a área das fibras e com a expressão da miogenina. Conclusão: Na insuficiência cardíaca, há redução da expressão gênica da miogenina e tendência ao aumento da MyoD em combinação com atrofia e necrose de fibras do músculo esquelético sóleo. Alterações musculares como diminuição da expressão da miogenina e necrose de fibras podem ocorrer precocemente durante o processo de insuficiência cardíaca.

8. ABSTRACT

Heart failure (HF) is characterized by exercise intolerance with early fatigue and dyspnea. Intrinsic alterations in skeletal muscle have been suggested to be involved in the reduced physical capacity. Muscle atrophy and changed myosin heavy chain (MyHC) isoforms have been frequently observed in clinical and experimental studies. The pathophysiological mechanisms responsible for muscle changes during HF are not defined. Cytokine activation mainly TNF- α and interleukin-6 (IL-6) may have a role in the alterations. Myogenic regulatory factors (MRF), a family of transcriptional factors, can modulate expression of several skeletal muscle specific proteins including MyHC and may participate in the heart failure-associated myopathy. In this study we evaluated rat skeletal muscle trophism, myosin heavy chain isoforms, and MRF gene expression during HF development. As TNF- α and IL-6 are increased in HF and associated with muscle changes, we also determined their serum levels. Methods: A coronary ligation model was employed to induce HF. Six months after the surgical procedure, three groups of animals were studied: Sham (n=9), infarcted rats without HF (MI/HF-, n=11), and infarcted rats with HF (MI/HF+, n=11). Cardiac structure and function were evaluated by transthoracic echocardiogram. Infarct size was measured by LV histological analysis. MRF MyoD, myogenin, and MRF4, and cyclophilin A (housekeeping gene) expression was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction in the soleus skeletal muscle. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed to evaluate MyHC isoforms (I and IIa). Histochemical analysis with myofibrillar ATPase was employed to analyze muscle fiber type and cross sectional fiber area. Muscle morphology was evaluated in hematoxylin and eosin stained sections. TNF- α and IL-6 serum concentrations were measured by ELISA. Results: Myocardial infarct size was greater in MI/HF+ than MI/HF- group (p=0,001). In the echocardiographic evaluation, the MI/HF- group presented left cardiac chambers dilation and left ventricular systolic and diastolic dysfunction compared to the Sham group. The cardiac alterations were more pronounced in the MI/HF+ than in the MI/HF-. Skeletal muscle fibers were normal in the Sham group. In all the MI/HF- animals, we observed scattered foci of fiber necrosis of one single cell or groups of fibers accompanied by inflammatory cells and areas of phagocytosis. These alterations

were also verified in the MI/HF+ group; in four rats the areas of necrosis were more frequent and larger and were combined with foci of increased fibrous tissue. The MI/HF+ group presented atrophy of type I, IC/IIC, and IIA fibers when compared to the Sham group ($p < 0.05$). Miogenin gene expression was similar in MI/HF- and MI/HF+ groups and lower than in the Sham ($p < 0.05$). There was a trend for MyoD expression to be higher in the MI/HF+ group ($p = 0.078$). MRF4 expression and MyHC distribution were not different among the groups ($p > 0.05$). MI/HF+ group had a higher TNF- α serum concentration than the Sham ($p = 0.009$). IL-6 serum levels were higher in MI/HF+ than in Sham and MI/HF- groups ($p < 0.001$). We observed a negative correlation between fiber areas and left atrium diameter to body weight ratio. TNF- α serum concentration was negatively correlated with both fiber area and miogenin expression. Conclusion: Rats with heart failure present skeletal muscle atrophy and necrosis in combination with a reduced miogenin expression and a trend for increased MyoD expression. Muscle changes such as fibers necrosis and decreased miogenin expression can occur early during the heart failure development.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mann DL. Management of heart failure patients with reduced ejection fraction. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, eds. *Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:611-640.
2. Albanesi Filho FM. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? *Arq Bras Cardiol*. 2005;85:155-156.
3. Rossi Neto JM. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004;14:1-9.
4. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1938-1947.
5. 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.
6. 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.
7. Minotti JR, Pillay P, Oka R, Wells L, Christoph I, Massie BM. Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure. *J Appl Physiol*. 1993;75:373-381.
8. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation*. 1993;87:470-475.
9. 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.
10. 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.
11. Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Yamada Y, Hanada A, Ohtsubo M, Morita N, Murakami T, Nishijima H, Kitabatake A. Comparisons of the skeletal muscle metabolic abnormalities in the arm and leg muscles of patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2004;68:573-579.

12. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999;115:836-847.
13. 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.
14. 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.
15. Supinski GS, Callahan LA. Diaphragmatic free radical generation increases in an animal model of heart failure. *J Appl Physiol*. 2005;99:1078-1084.
16. 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.
17. 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.
18. Williams AD, Selig S, Hare DL, Hayes A, Krum H, Patterson J, Geerling RH, Toia D, Carey MF. Reduced exercise tolerance in CHF may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. *J Card Fail*. 2004;10:141-148.
19. Filippatos GS, Kanatselos C, Manolatos DD, Vougas B, Sideris A, Kardara D, Anker SD, Kardaras F, Uhal B. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: A comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol*. 2003;90:107-113.
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. Shah K, Ganguly P, Netticadan T, Arneja A, Dhalla N. Changes in skeletal muscle SR Ca²⁺ pump in congestive heart failure due to myocardial infarction are prevented by angiotensin II blockade. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82:438-447.
24. Niebauer J, Pflaum CD, Clark AL, Strasburger CJ, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD. Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:393-397.
25. Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2006;109:179-187.
26. Larsen AI, Lindal S, Aukrust P, Toft I, Aarsland T, Dickstein K. Effect of exercise training on skeletal muscle fibre characteristics in men with chronic heart failure. Correlation between skeletal muscle alterations, cytokines and exercise capacity. *Int J Cardiol*. 2002;83:25-32.
27. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure. An overview. *Heart*. 2004;90:464-470.
28. 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.
29. Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF- α and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1871-1878.
30. Schulze PC, Gielen S, Adams V, Linke A, Möbius-Winkler S, Erbs S, Kratzsch J, Hambrecht R, Schuler G. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulin-like growth factor-1 in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2003;98:267-274.

31. Reid MB, Lännergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α . *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:479-484.
32. Li X, Moody MR, Engel D, Walker S, Clubb FJ, Sivasubramanian N, Mann DL, Reid MB. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. *Circulation*. 2000;102:1690-1696.
33. Thomas GD, Zhang W, Victor RG. Impaired modulation of sympathetic vasoconstriction in contracting skeletal muscle of rats with chronic myocardial infarctions. Role of oxidative stress. *Circ Res*. 2001;88:816-823.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH. Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol*. 2002;87:182-186.
38. 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.
39. Lopes FS. Expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca. Dissertação de Mestrado

- apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2005:62.
40. Schiaffino S, Reggiani C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1994;77:493-501.
 41. Lompré A-M, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984;259:6437-6446.
 42. di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hyperthyroidism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278:R1099-1106.
 43. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, M. V, Gundersen K, Lømo T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1989;10:197-205.
 44. DeNardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, Schiaffino S. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol.* 1993;123:823-835.
 45. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry.* 1989;92:453-457.
 46. Staron RS, Pette D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry.* 1993;100:73-80.
 47. Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiol.* 1997;83:1291-1299.
 48. 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.
 49. 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.

50. Hughes SM, Koishi 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.
51. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:723-732.
52. 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.
53. 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.
54. Dasarathy S, Muc S, Hisamuddin K, Edmison JM, Dodig M, McCullough AJ, Kalhan SC. Altered expression of genes regulating skeletal muscle mass in the portcaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G1105-G1113.
55. 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.
56. Mozdziak PE, Geaser ML, Schultz E. Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J Appl Physiol.* 1998;84:1359-1364.
57. Carlsen H, Gundersen K. Helix-loop-helix transcription factors in electrically active and inactive skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 2000;23:1374-1380.
58. Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 2001;15:1169-1180.
59. 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.

60. 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.
61. Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1997;96:4002-4010.
62. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res.* 1994;75:23-32.
63. Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, Brooks WW, Conrad CH, Bing OHL. Heart failure after long-term supraaortic constriction in rats. *Am J Hypertens.* 2005;18:202-212.
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. Martinez PF, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Lima ARR, Gosuen GB, Damatto RL, Cicogna AC, Okoshi K, Okoshi MP. Caracterização clínica e anátomo-patológica da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. *Arq Bras Cardiol.* submetido.
66. 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.
67. 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.
68. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, Cicogna AC, Campana AO. Ventricular remodeling induced by retinoic acid

- supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H2242-H2246.
69. 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.
 70. 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.
 71. Matsubara LS, Bojikian BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol*. 2000;279:H1534-H1539.
 72. 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.
 73. 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.
 74. Brooke MH, Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *J Histochem Cytochem*. 1970;18:670-672.
 75. Dubowitz V. *Muscle Biopsy: a Practical Approach*. 2nd ed. London: Baillière Tindall; 1985.
 76. 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.
 77. Vizotto VA, Carvalho RF, Sugizaki MM, Lima AP, Aragon FF, Padovani CR, Castro AVB, Dal Pai-Silva M, Nogueira CR, Cicogna AC. Down-regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum ryanodine channel in severely food-restricted rats. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:27-31.

78. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
79. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, al. e. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res.* 1991;68:1390-1400.
84. 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.
85. Brooks WW, Healey N, Sen S, Conrad CH, Bing OHL. Oxygen cost of stress development in hypertrophied and failing hearts from the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1993;21:56-64.
86. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Wasting as independent risk factor of mortality in chronic heart failure. *Lancet.* 1997;349:1050-1053.

87. Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med.* 2001;58:742-749.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation.* 1990;81:518-527.
92. Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Barbera MD, Angelini A, Betto DD, Germinario E, Vescovo G. Beneficial effects of GH/IGF-I on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C138-C144.
93. 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.
94. Filippatos GS, Anker SD, Kremastinos DT. Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8:249-254.
95. Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:1135-1144.
96. Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N, Delafontaine P. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest.* 2005;115:451-458.

97. Vescovo G, Dalla Libera L, Serafini F, Leprotti C, Facchin L, Volterrani M, Ceconi C, Ambrosio GB. Improved exercise tolerance after losartan and enalapril in heart failure. Correlation with changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition. *Circulation*. 1998;98:1742-1749.
98. 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.
99. Toth MJ, Palmer BM, LeWinter MM. Effect of heart failure on skeletal muscle myofibrillar protein content, isoform expression and calcium sensitivity. *Int J Cardiol*. 2006;107:211-219.
100. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:61-86.
101. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24:893-899.
102. McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387:83-90.
103. Schulze PC, Fang J, Kassik KA, Gannon J, Cupesi M, MacGillivray C, Lee RT, Rosenthal N. Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ Res*. 2005;97:418-426.
104. Hughes SM, Chi MM-Y, Lowry OH, Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol*. 1999;145:633-642.
105. 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.
106. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK. Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Cell Physiol*. 1991;261:H434-H442.

107. Pfeifer C, Musch TI, Mcallister RM. Skeletal muscle oxidative capacity and exercise tolerance in rats with heart failure. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:542-548.
108. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation.* 1992;85:1751-1759.
109. 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.
110. Russel ST, Sanders PM, Tisdale MJ. Angiotensin II directly inhibits protein synthesis in murine myotubes. *Cancer Letters.* 2006;231:290-294.
111. Brink M, Price SR, Chrast J, Bailey JL, Anwar A, Mitch WE, Delafontaine P. Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I. *Endocrinology.* 2001;142:1489-1496.
112. Ng YL, Goldspink DF, Burniston JG, Clark WA, Colyer J, Tan L-B. Characterisation of isoprenaline myotoxicity on slow-twitch skeletal versus cardiac muscle. *Int J Cardiol.* 2002;86:299-309.