

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Influência do hormônio de crescimento sobre a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos com insuficiência cardíaca

Denis Pioli dos Santos

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

BOTUCATU - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

Influência do hormônio de crescimento sobre a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos com insuficiência cardíaca

Denis Pioli dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Valéria Barros de Castro

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

BOTUCATU – SP

2008

Dedicatória

“Aos meus pais, Antonio Carlos e Orilde, aos meus irmãos Alan e Natália, e ao grande amigo Adriano (in memorian)”.

Agradecimentos

Já houve quem dissesse que um homem é feliz pelos amigos que tem. Neste sentido minha fortuna não poderia ser maior: pais-amigos, irmãos-amigos, professores-amigos, alunos-amigos, amigos-amigos, amigos ocasionais, amigos duradouros, amigos desconhecidos que os livros revelam... amigos tantos que muito me ensinaram e que são os grandes responsáveis pela pessoa que sou hoje.

Minha lista de agradecimentos, portanto, não poderia ser menor que minha fortuna. Contudo, como não seria de bom alvitre citar nominalmente cada uma dessas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram comigo na elaboração deste trabalho – mesmo porque o espaço é pequeno, pelo menos alguns nomes se faz necessário, sem o que constituiria uma imperdoável injustiça.

Minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela oportunidade e pelos valiosos conselhos prestados em minha formação, pela paciência, dedicação, profissionalismo e principalmente por sempre incentivar na busca de novos objetivos.

Minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Valéria Barros de Castro, por abrir as portas da sociedade científica, pela competência na orientação, perseverança e otimismo. Nossa convivência contribuiu muito para meu amadurecimento profissional e pessoal.

Minha mãe, porque é minha mãe, e isso bastaria, mas ela sempre fez questão de fazer muito mais.

Meu pai, não apenas pela força e incentivo, mas pelo apoio financeiro que foi fundamental.

Meus queridos irmãos, Alan e Natália, minha cunhada Amanda e minha sobrinha Giovanna que vai nascer.

Meus amigos Prof. Dr. Katashi Okoshi, Prof. Titular Antônio Carlos Cicogna e Prof. Titular Carlos Roberto Padovani, pela atenção e dedicação na construção deste trabalho.

Fábio e Cristiane, por que foram na frente e mostraram como era.

Fernanda Losi, pela paciência.

Ulysses e Valery, pelo carinho – e sua família, pelo apoio.

Francis, pela força e revisão.

Robson, pela disposição.

Wellcy, pela confiança.

Aos amigos de laboratório, André Leopoldo, André Nascimento, Ana Paula, Sandro, Fábio, Paula, Silvio, Rosângela, Cristiane, Vitor, Dijon, Vanessa, Vivian, Aline, Danilo, Fernanda Carani, Andreo, Sueli, Luciana e Justulin.

Tios, tias, primos e primas (por direito herdado ou adquirido), pelo respeitoso silêncio e mudanças de assunto.

Aqueles que, após me perguntarem sobre o tema da dissertação, tiveram a paciência de me ouvir. E, ao final, perguntaram, perplexos e tímidos: tudo bem, mas o que são Fatores de Regulação Miogênica, mesmo?

Os amigos e desconhecidos que fazem da Internet uma comunidade, pela rede de conhecimentos, confiança e ajuda mútua.

Os que eventualmente ficaram de fora, porque sabem como eu sou distraído.

Peço a Deus que continue sendo lâmpadas em meus pés, iluminando sempre meu caminho a cada passo.

ÍNDICE

Resumo	05
Abstract	07
I – INTRODUÇÃO	08
Desenvolvimento Embrionário do Músculo Esquelético.....	08
Fatores de Regulação Miogênica.....	09
Eventos celulares na formação dos Músculos Esqueléticos.....	12
Características das Fibras Musculares Esqueléticas Adultas.....	14
Matriz extracelular do músculo esquelético.....	17
Plasticidade do Músculo Esquelético.....	19
Insuficiência Cardíaca.....	19
Alterações nas Fibras do Músculo Esquelético na IC.....	20
Mecanismos Responsáveis pelas Mudanças dos Tipos de Fibras Musculares na Insuficiência Cardíaca.....	20
Alterações da Matriz Extracelular do Músculo Esquelético na IC.....	21
Alteração Neurohormonal.....	21
II – OBJETIVO	23
III – METODOLOGIA	24
Animais e Protocolo Experimental.....	24
Indução da Insuficiência Cardíaca por EAo	24
Avaliação Estrutural e Funcional do Coração pelo Ecocardiograma (ECO)...	25
Critério para Seleção dos Animais.....	27
Grupo Experimental.....	28
Sacrifício dos Animais e Coleta do Material do Estudo.....	29
Análise Morfológica	29
Avaliação Hormonal.....	29
Avaliação da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica da família bHLH por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT - PCR).....	30
IV - ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
V- RESULTADOS	35
VI – DISCUSSÃO	40
VII – CONCLUSÃO	45
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Resumo

Este estudo avaliou a influência do hormônio de crescimento (GH) sobre a morfometria e a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica, assim como a dosagem sérica de IGF-1. Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal inicial de 70 a 80g, mantidos em gaiolas individuais, à temperatura de 23°C, com ciclos de luminosidade de 12h e foram alimentados durante todo o período experimental com ração e água *ad libitum*. Para a indução da estenose aórtica, os animais foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Quando apresentaram taquipnéia, que sugere uma disfunção ventricular na fase de hipertrofia compensada, caracterizando o estágio de remodelação cardíaca, observado em média na 25 semana pós indução de estenose aórtica e submetidos ao ecocardiograma utilizado para o cálculo do estágio da remodelação cardíaca pela técnica de Fisher. Utilizou-se 21 animais divididos em três grupos: Controle (C: n=7), Estenose Aórtica + Placebo (EAo: n=7) e Estenose Aórtica + Hormônio de Crescimento (EAo+GH: n=7). O GH humano foi administrado por via subcutânea na dose de 2 mg/kg/dia, durante 14 dias. Após o segundo ecocardiograma, realizado após 14 dias de tratamento com GH, os animais foram eutanasiados, pesados e o sangue foi retirado para a dosagem do IGF-1. Após a retirada e pesagem do músculo sóleo, fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido. Cortes histológicos com 8 µm, obtidos em criostato a -20 °C, e submetidos à coloração HE e Picosírios-red. Esse material foi utilizado para o cálculo na área das fibras, e análise da distribuição do colágeno. A avaliação da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MRFs) Miogenina e MyoD foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT - PCR). O peso dos animais foi semelhante entre os grupos estudados. A razão do peso do músculo sóleo/PC apresentou-se igual em todos os grupos. A área das fibras do músculo sóleo foi significativamente menor no grupo EAo em relação ao C. No grupo EAo+GH observou-se aumento significativo na área das fibras em relação ao grupo EAo, não encontrada entre os grupos C e EAo+GH. Os índices de fibrose foram significativamente maiores no grupo EAo, tratados ou não com GH, em relação ao C. No grupo EAo+GH houve redução significativa de (20,9%) da fibrose no músculo em relação ao grupo EAo. Os níveis de IGF-1 no soro mostraram-se diminuídos no grupo EAo quando comparados ao grupo C. A expressão gênica da miogenina foi semelhante entre os grupos estudados, porém a expressão gênica da MyoD aumentou significativamente no grupo EAo+GH em relação ao EAo, não sendo significativo quando comparado ao grupo C. Na insuficiência cardíaca a redução da expressão do fator de regulação miogênica e MyoD é acompanhada da atrofia do músculo sóleo e fibrose muscular. O GH promoveu a hipertrofia do músculo sóleo, diminuição da fibrose e aumento da expressão

da MyoD em ratos com insuficiência cardíaca crônica. Os resultados mostram que o GH pode ser uma proposta de terapia coadjuvante para portadores de insuficiência cardíaca.

Abstract

This study evaluated the effect of growth hormone on the morphometry and myogenic regulatory factor expression in skeletal muscle of rats with aortic stenosis induced chronic heart failure, and determined serum IGF-1 levels. Male 70 to 80g Wistar rats were kept in individual cages at 23°C, with 12h light dark cycles, and were fed food and water ad libitum throughout the experimental period. For aortic stenosis, animals underwent thoracotomy and median trichotomy after anesthesia with ketamine hydrochloride (50mg/kg IM) and xylidine hydrochloride (10mg/Kg IM). The ascending aorta was then dissected and a 0.6mm internal diameter silver clip was placed approximately 3mm from its root.

When rats presented tachypnea, suggesting ventricular dysfunction at the compensated hypertrophy stage, characterizing the cardiac remodeling stage, which was on average 25 weeks after aortic stenosis induction, they were submitted to echocardiogram to calculate cardiac remodeling stage by the Fisher technique.

Twenty one animals were divided into three groups: C - control (n=7), EAo - aortic stenosis + placebo (n=7), and GH - aortic stenosis + growth hormone (n=7). Human GH was administered subcutaneously at 2mg/kg/day for 14 days. After a second echocardiogram, performed after 14 days of GH treatment, rats were sacrificed and weighed. Blood was withdrawn for IGF-1 determination. Soleus muscles were removed and weighed, and fragments frozen in liquid nitrogen. Histological sections (8µm), obtained in a cryostat at -20°C were stained with HE and Picrosirius-red. This material was used to calculate muscle fiber area and analyze collagen distribution in muscle. Myogenic regulatory factors Myogenin and MyoD gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR.

Animal body weights were similar between groups. Sol weight/body weight was similar between groups. Soleus muscle fiber area was significantly lower in EAo than C. Soleus muscle fiber area in EAo+GH was significant higher than EAo. Fibrosis was significantly higher in EAo, treated or not with GH, in relation to C. There was significant reduction in fibrosis (20.9%) in EAo+GH compared to EAo. Serum IGF-1 levels decreased in EAo compared to C.

Myogenin mRNA levels were similar between groups, but MyoD mRNA significantly increased in EAo+GH in relation to EAo; this was not significant when compared to C. Reduced MyoD mRNA expression in heart failure was accompanied by soleus atrophy and muscular fibrosis. GH promoted soleus muscle hypertrophy, decreased fibrosis, and increased MyoD mRNA expression in rats with chronic heart failure. These results show a potential role for GH in coadjuvant therapy for individuals with heart failure.

I - Introdução

Desenvolvimento Embrionário do Músculo Esquelético

A maioria dos músculos esqueléticos de aves e mamíferos com exceção de alguns músculos craniofaciais e esofágicos são formados a partir dos somitos; condensações transitórias do mesoderma paraxial originadas em cada lado do tubo neural do embrião (revisados em Summerbell & Rigby, 2000; Pourquie, 2001; Pownall, *et al.*, 2002). Os somitos diferenciam-se ao longo do eixo dorso-ventral do embrião e originam o dermomiótomo localizado dorsalmente, e o esclerótomo localizado ventralmente (Figura 1). O dermomiótomo origina a derme e a musculatura esquelética dos membros e tronco, enquanto que o esclerótomo origina a cartilagem e os ossos das vértebras e costelas.

A porção epaxial do dermomiótomo origina a musculatura profunda do dorso, a partir de células progenitoras da borda medial dorsal (BMD) que migram profundamente do dermomiótomo, saem do ciclo celular, se alongam e diferenciam-se em fibras musculares (Christ & Ordahl, 1995; Amthor, *et al.*, 1999) (Figura 1). Um padrão similar de eventos induz a formação da borda lateral ventral (BLV) para estabelecer o dermomiótomo hipoaxial não migratório, o qual originará a musculatura lateral do tronco. Algumas células da BLV se separam do dermomiótomo e migram ventralmente para regiões de desenvolvimento dos músculos esqueléticos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma.

A regulação do processo de formação dos músculos esqueléticos envolve a apropriada ativação, proliferação e diferenciação de várias linhagens de células miogênicas e depende da expressão e atividade de fatores transcricionais, conhecidos como fatores de regulação miogênica.

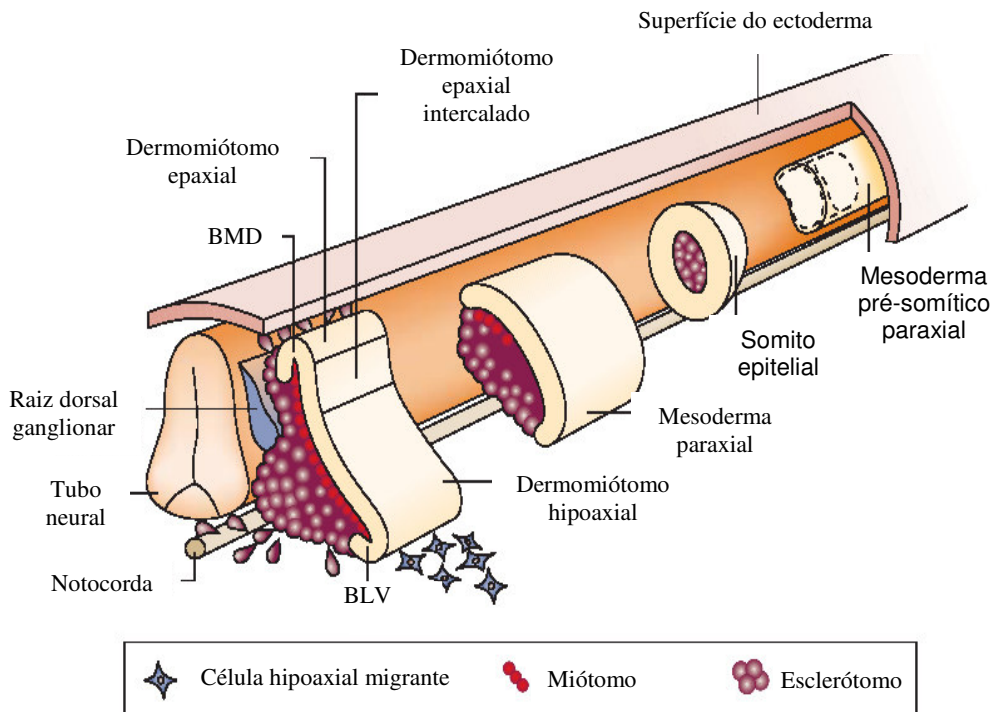


Figura 1. Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros. O mesoderma paraxial pré-somítico está localizado em cada lado da notocorda. A segmentação do mesoderma paraxial em somitos ocorre ao longo do eixo dorso-ventral e em uma direção cefálica – caudal do embrião. Em resposta a sinais da notocorda e do tubo neural, os somitos se diferenciam e subdividem-se para originar o dermomiótomo e o esclerótomo. Células da borda medial dorsal (BMD) do dermomiótomo migram profundamente do dermomiótomo para formar o dermomiótomo epaxial. Um evento semelhante ocorre na borda lateral ventral (BLV) do dermomiótomo, para a formação do dermomiótomo hipoaxial. Algumas células da BLV se separam do dermomiótomo e migram para regiões de desenvolvimento dos músculos da parede ventral do corpo, da língua, dos membros e do diafragma (células hipoaxiais migrantes) (adaptado de Parker, *et al.*, 2003).

Fatores de Regulação Miogênica

Durante o desenvolvimento embrionário, o comprometimento das células somíticas do mesoderma com a linhagem miogênica depende inicialmente de sinais positivos [Wnts, Sonic hedgehog (Shh), *Noggin*] ou negativos (BMP4) oriundos de tecidos circundantes, tais como a notocorda e o tubo neural (revisado em Chargé & Rudnicki, 2004). Esses sinais irão ativar os genes

capazes de transformar células não musculares em células com um fenótipo muscular.

Os genes responsáveis por essa transformação são membros da família dos fatores transcricionais “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4; coletivamente chamados de fatores de regulação miogênica (do inglês, *myogenic regulatory factors* ou MRFs). Os MRFs compartilham um domínio homólogo bHLH, que é necessário para a ligação com o DNA e para a dimerização com fatores transcricionais da família da proteína E. Os heterodímeros MRF-proteína E e os monômeros de MRFs ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo – específicos, levando à expressão dos mesmos (Murre, *et al.*, 1989; Lassar, *et al.*, 1991) (Figura 2).

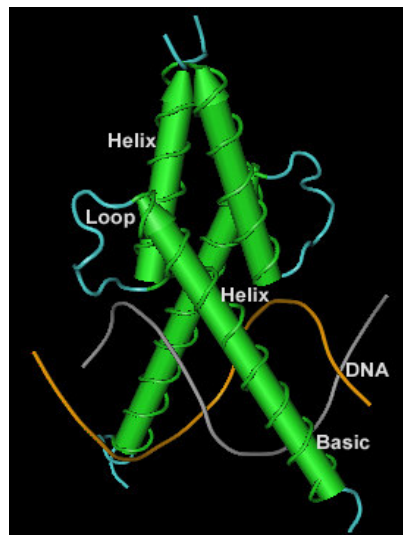


Figura 2. Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcricional da família “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH) MyoD e o DNA (adaptado de Ma, *et al.*, 1994).

Assim como os MRFs, a família de fatores transcricionais MEF2 (do inglês, *myocyte enhancer factor-2*) também está envolvida na ativação de genes músculo - específicos (revisado em Naya & Olson, 1999). Os MEF2 são expressos em muitos tecidos, mas é apenas durante o desenvolvimento dos músculos cardíaco, liso e estriado que esses fatores ativam a transcrição (Naya, *et al.*, 1999). Estudos demonstram uma ação interdependente entre a família MEF2 e os MRFs no controle da diferenciação do músculo esquelético (Novitch, *et al.*, 1996; Novitch, *et al.*, 1999; Ridgeway, *et al.*, 2000)

Na diferenciação do músculo esquelético, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão dos MRFs Myf5 e MyoD (Figura 3). Isso é demonstrado pela total ausência de tecido muscular em camundongos duplo *Knockout MyoD:Myf5* e pela observação de que, nesses animais, as supostas células progenitoras musculares permanecem multipotentes e contribuem para tecidos não musculares do tronco e dos membros desses camundongos (Rudnicki, *et al.*, 1993; Kablar, *et al.* 1998; Palmer & Rudnicki, 2001). As células da linhagem miogênica em proliferação, positivas para Myf5 e/ou MyoD, são então denominadas de mioblastos (Megeney & Rudnicki, 1995).

Embora a MyoD e o Myf5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser “pré-comprometidas” com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse “pré-comprometimento” é realizado pelo fator transcricional Pax3, da família Pax (do inglês, *paired-box*), o qual é expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais (Goulding, *et al.*, 1994; Williams & Ordahl, 1994). Já no dermomiótomo, as células precursoras, que apresentam expressão de Pax3 induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma superficial, são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação; contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica (Amthor, *et al.*, 1999) (Figura 3).

Os mioblastos que saem do ciclo celular, positivos para Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares (Figura 3) (Megeney & Rudnicki, 1995). Embriões deficientes em miogenina morrem no período perinatal devido à deficiência na diferenciação dos miócitos, evidenciada pela quase total ausência de fibras musculares nesses mutantes (Hasty, *et al.*, 1993; Nabeshina, *et al.*, 1993). Similarmente, camundongos deficientes em MRF4 demonstram uma série de fenótipos consistentes com seu papel na diferenciação dos miócitos durante a miogênese (Patapoutian, *et al.*, 1995; Rawls, *et al.*, 1995; Yoon, *et al.*, 1997).

Finalmente, no processo de miogênese, os miócitos mononucleados se fundem para formar os miotubos (Figura 3) e, no animal adulto, o músculo

esquelético torna-se um tecido estável, caracterizado por fibras musculares multinucleadas (Decary, *et al.*, 1997; Schmalbruch & Lewis, 2000).

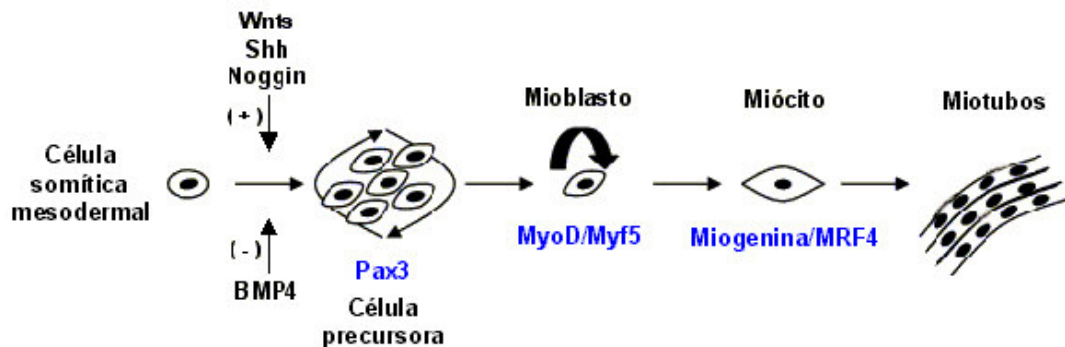


Figura 3. Células somíticas mesodermis recebem sinais de tecidos circundantes os quais podem induzir [Wnts, Sonic hedgehog (Shh), Noggin] ou inibir (BMP4) a expressão de Myf5 e MyoD. A expressão de Pax3 nas células precursoras contribui para a expansão das células miogênicas. Após a indução de Myf5 e/ou MyoD, as células somíticas mesodermis são comprometidas com a linhagem miogênica (mioblastos). A expressão de miogenina e MRF4 induz a diferenciação dos mioblastos em miócitos. Posteriormente, os miócitos se fundem para originar os miotubos (Amthor, *et al.*, 1999).

Eventos celulares na formação dos Músculos Esqueléticos

A formação dos músculos dos membros e do diafragma envolve pelo menos duas populações de mioblastos, os primários e os secundários (Hauschka, 1994) (Figura 4). A caracterização *in vitro* dessas duas populações de células demonstra uma distinção quanto à morfologia dos clones e às necessidades de meio de cultura (White, *et al.*, 1975, Rutz, *et al.*, 1982; Seed & Hauschka, 1994). Além disso, há uma diferença na expressão das isoformas de cadeia pesada de miosina entre essas duas populações de células, sugerindo que os mioblastos primários são destinados a originar fibras lentas, enquanto que os secundários são destinados a originar fibras rápidas (para uma revisão, Stockdale, 1992). Entretanto, experimentos demonstram a importância de outros fatores, como a inervação, na determinação dos tipos de fibras musculares (Hughes & Blau, 1992; Pin & Merrifield, 1997).

A formação dos miotubos a partir dos mioblastos ocorre a partir de dois eventos distintos temporalmente (Figura 4). Inicialmente, ocorre a formação dos miotubos primários, os quais apresentam núcleos localizados na região

central, e miofibrilas, na região periférica do sarcoplasma (Kelly & Zacks, 1969; Ontell & Kozeka, 1984). Esses miotubos fornecem um suporte (andaime) para a posterior formação dos miotubos secundários a partir da proliferação e fusão de mioblastos adjacentes aos miotubos primários (Ontell & Kozeka, 1984; Ross *et al.*, 1987). Posteriormente, ocorre a separação dos miotubos primários e secundários e a diferenciação em fibras primárias e secundárias; os núcleos migram para a região periférica e as miofibrilas passam a ocupar todo o sarcoplasma (Ontell & Kozeka, 1984; Ross, *et al.*, 1987).

Durante o processo da miogênese, uma distinta população de mioblastos não se diferencia e permanece quiescente entre a membrana plasmática da fibra muscular em desenvolvimento e a lâmina basal, sendo denominados de células satélites ou mioblastos indiferenciados (Mauro, 1961). As células satélites são as responsáveis pela regeneração e crescimento pós-natal do músculo esquelético (para uma revisão, Chargé & Rudnicki, 2004) (Figura 4).

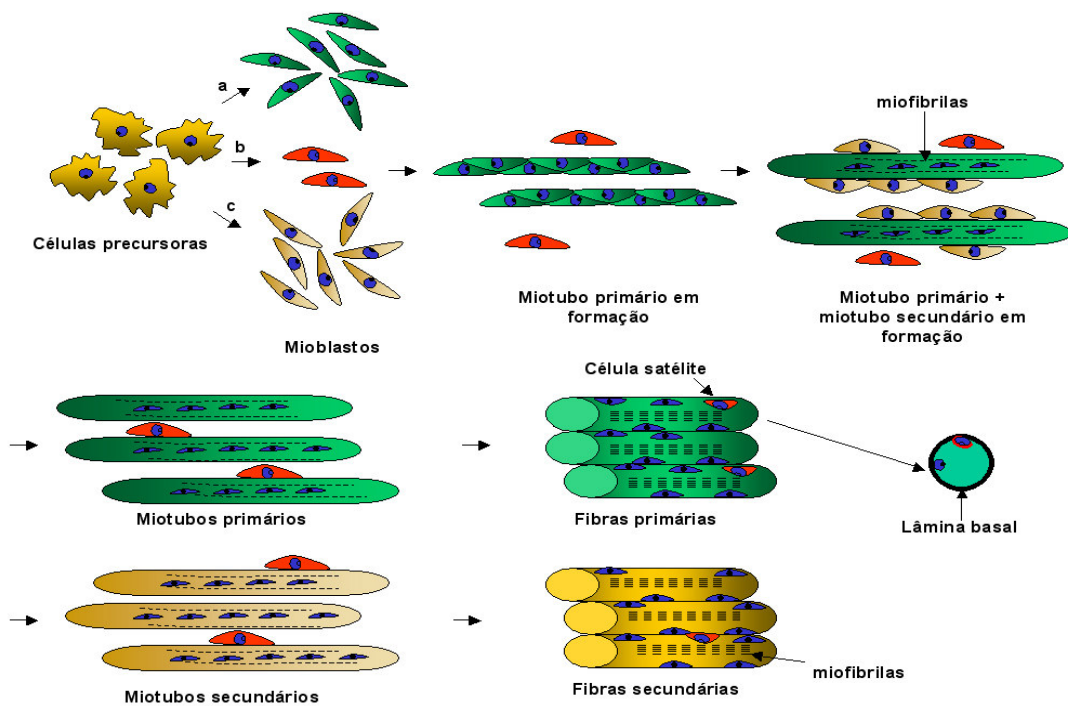


Figura 4. Formação das fibras musculares estriadas. As células precursoras originam diferentes populações de mioblastos (a,b e c). Alguns mioblastos (a) se alinham e fundem-se formando os miotubos primários, que apresentam núcleos na região central e, iniciam a síntese de miofibrilas que ocupam a região periférica no sarcoplasma do miotubo. Os miotubos primários fornecem o suporte para a subsequente formação dos miotubos secundários, a partir de outra população de mioblastos (c). Posteriormente ocorre a separação dos miotubos primários e secundários e a diferenciação em fibras primárias e secundárias. Os núcleos das fibras migram para a região periférica da fibra e as miofibrilas passam a ocupar todo o sarcoplasma. Alguns mioblastos (b), denominados de células satélites, não se fundem e permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra e a lâmina basal (Dal Pai-Silva *et al.*, 2005).

Características das Fibras Musculares Esqueléticas Adultas

Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (Ranvier, 1873). A cor vermelha está relacionada com a presença do pigmento mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos estriados dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (Dubowitz & Pearse, 1960). Inicialmente, as fibras musculares foram classificadas em vermelhas,

intermediárias e brancas (Ogata, 1958). Posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina (ATPase miofibrilar ou m-ATPase) (Brooke & Kaiser, 1970).

A molécula de miosina é um hexâmero formado por duas cadeias pesadas de miosina (do inglês, *myosin heavy chain* ou MHC), enroladas em α -hélice, e quatro cadeias leves de miosina (do inglês, *myosin light chain* ou MLC) (Lowey, *et al.*, 1969; Weeds & Lowey, 1971; Elliot & Offer, 1978; Warrick & Spudich, 1987). Cada cadeia pesada pode ser separada em duas porções: meromiosina leve, em forma de bastão, e meromiosina pesada, conhecida como porção globosa da miosina, a qual apresenta o sítio de ligação com a actina e a região capaz de ligar-se à molécula de ATP e hidrolisá-la (atividade ATPásica) (Huxley, 1969; Lowey, *et al.*, 1969) (Figura 5).

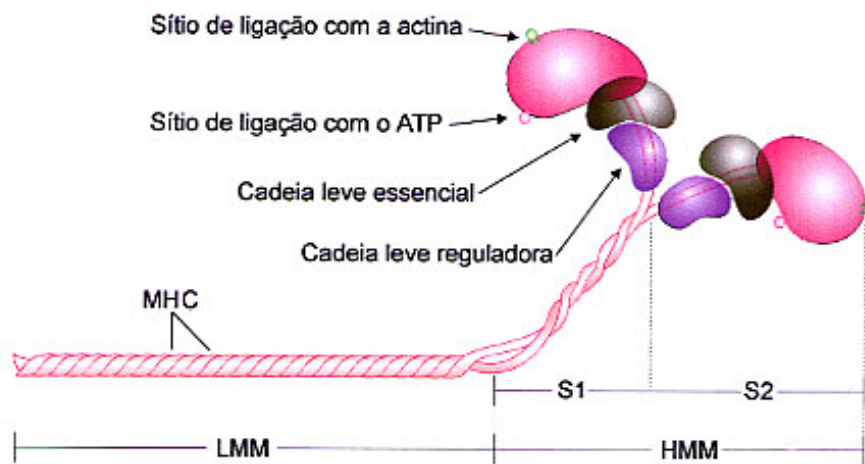


Figura 5. Esquema da molécula de miosina da classe II. Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves de miosina (MLC). As MHC podem ser clivadas e gerar as meromiosina leves (LMM) e meromiosina pesadas (HMM). As HMM são compostas pela porção globosa S1 e pela porção α hélice em forma de bastão, S2. As MLC estão dispostas na proporção de duas cadeias (uma essencial e uma reguladora) para cada subfragmento S1 (Dal Pai-Silva, *et al.*, 2005).

Ashmore & Doerr (1971), utilizando a combinação das reações histoquímicas para detecção da atividade das enzimas m-ATPase e succinato desidrogenase (SDH), classificaram as fibras musculares como β Red, α Red e α White. Posteriormente, Peter, *et al.*, (1972), classificaram as fibras musculares em SO (*slow oxidative*), FOG (*Fast oxidative glycolytic*) e FG (*Fast glycolytic*), baseando-se na combinação das reações histoquímicas e na detecção da atividade das enzimas m-ATPase e NADH tetrazólio redutase (NADH-TR).

Estudos mais recentes, envolvendo a microdissecção de fibras e, associando a reação histoquímica m-ATPase com a técnica da eletroforese, possibilitaram a separação de quatro isoformas de cadeia pesada de miosina (MHC) presentes nas fibras musculares: fibras do tipo I, com MHC I, fibras do tipo IIA, com MHC IIa, fibras do tipo IIB, com MHC IIb e fibras do tipo IID com MHC IIc (Termin, *et al.*, 1989). A MHC IIc está presente nos músculos de pequenos mamíferos e possui uma velocidade de contração intermediária entre as MHC IIa e MHC IIb (Hilber, *et al.*, 1999). As fibras IID apresentam características histoquímicas e bioquímicas similares às fibras 2X descritas em ratos (Larsson *et al.*, 1991), camundongos e coelhos (Hämäläinen & Pette, 1993), sendo também denominadas de fibras IID/IIX (para uma revisão ver Scott, *et al.*, 2001). Baseado em vários tipos de evidências e na análise de seqüências de DNA, a MHC originalmente identificada em humanos como MHC IIb é na verdade homóloga à MHC IIc/IIX presente nas fibras IID/IIX de pequenos mamíferos (Pette & Staron, 1997). Portanto, os humanos expressam as seguintes isoformas de MHC (da mais lenta para a mais rápida): MHC I, MHC IIa e MHC IIc/d (Staron, 1997); e não expressam a mais rápida isoforma de todas as MHC, a MHC IIb (Hilber, *et al.*, 1999).

As fibras do tipo I, IIA, IID/X e IIB são classificadas como fibras puras (Pette & Staron, 1997; Staron, *et al.*, 1999). Porém, além das fibras puras, que expressam apenas um tipo de RNA mensageiro para a MHC, há fibras que co-expressam diferentes genes para a MHC (Biral, *et al.*, 1988; Aigner, *et al.*, 1993; Schiaffino & Reggiani, 1994; Caiozzo, *et al.*, 2003). Essas fibras são classificadas de acordo com o tipo de MHC predominante: (IC=MHC I>MHC IIa, IIC=MHC IIa>MHC I, IIAD=MHC IIa>MHC IIc, IIBD=MHC IIb>MHC IIc), sendo

denominadas de fibras híbridas ou polimórficas (Staron & Pette, 1993; Di Maso, *et al.*, 2000).

A velocidade de contração de uma fibra muscular está diretamente relacionada com o tipo de MHC (revisado em Talmadge, *et al.*, 1993). A MHC capaz de rápida hidrólise do ATP é característica das fibras do tipo II, que são fibras de contração rápida. Já a MHC de baixa atividade ATPásica é encontrada nas fibras do tipo I, de contração lenta (Kelly & Rubinstein, 1994).

A identificação das características contráteis das fibras musculares é importante, pois como os músculos são compostos por vários tipos de fibras musculares, suas propriedades refletem a soma das características das fibras que o constituem. Isso é possível na estrutura da matriz extracelular do músculo esquelético que permite a combinação das forças geradas pela contração de várias fibras musculares, a qual é transformada em movimento via junções miotendinosas, onde as fibras musculares se aderem ao esqueleto pelos tendões (revisado em Kjaer, 2004).

Matriz extracelular do músculo esquelético

As fibras musculares estão envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo; organizado em três bainhas: epimísio, que circunda todo o músculo; perimísio, que divide o músculo em fascículos e endomísio, que circunda cada fibra muscular (para uma revisão ver Sanes, 2003 e Kjaer, 2004) (Figura 6).

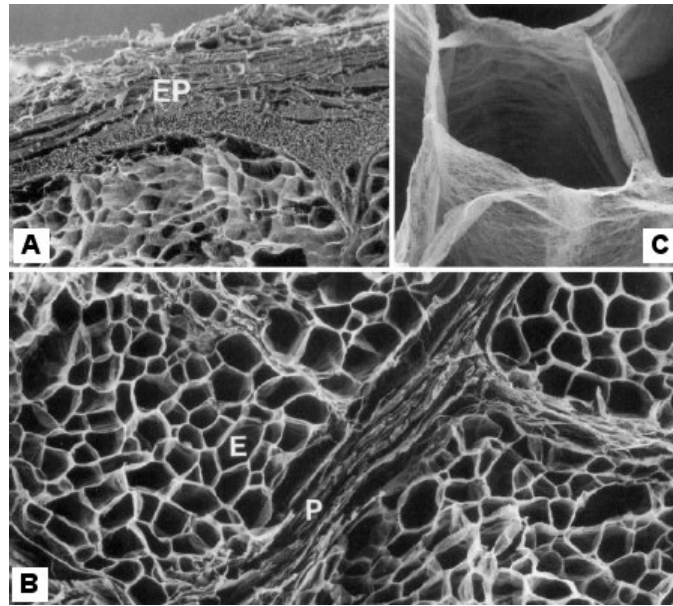


Figura 6. Estrutura da matriz extracelular do músculo esquelético. Músculo semitendinoso bovino após remoção das proteínas das fibras musculares (microscopia eletrônica de varredura). A: Epimísio (EP), B: Perimísio (P) e Endomísio (E). C: Detalhe do endomísio circundando uma fibra muscular esquelética. (adaptado de Kjaer, 2004)

Estudos de microscopia óptica revelaram inicialmente que cada fibra muscular está envolvida por um delicado tubo, denominado sarcolema, formado por 3 componentes: fibrilas reticulares, que seguem um curso em espiral ao redor da fibra (Borg & Caulfield, 1980), membrana basal (Zacks *et al.*, 1973; Borg & Caulfield, 1980) e membrana plasmática da fibra muscular. A membrana basal é formada por duas discretas camadas: a lâmina reticular e a lâmina basal (Mauro & Adams, 1961). Posteriormente, estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a lâmina basal é ainda subdividida em lâmina densa (10 a 15 nm de espessura) e lâmina rara (2 a 5 nm de espessura), adjacente à membrana plasmática (Inoue, 1989). Os principais componentes da membrana basal são: laminina, fibronectina, entactina, heparam sulfato e os colágenos dos tipos I, III, IV, V e VI (Duance, *et al.*, 1977; Duance, *et al.*, 1980; Walsh, *et al.*, 1981; Foidart, *et al.*, 1981; Sanes, 1982; Stephens, *et al.*, 1982; Bayne, *et al.*, 1984; Linsenmayer, *et al.*, 1986; Eldridge, *et al.*, 1986; Lehto, *et al.*, 1988). Na superfície externa da membrana plasmática, observa-se uma camada de glicoproteínas, o glicocálix, que se continua com a lâmina basal.

Poucas moléculas têm sido localizadas no epimísio e no perimísio (Bailey & Sims, 1977; Duance, *et al.*, 1977; Duance, *et al.*, 1980; Foidart, *et al.*,

1981; Sanes, 1982; Stephens, *et al.*, 1982; Linsenmayer, *et al.*, 1986; Lehto, *et al.*, 1988; Light & Champion, 1984). A fibronectina está presente em ambas camadas, bem como os colágenos dos tipos V e VI. O colágeno do tipo I está concentrado no epimísio e o colágeno do tipo III no perimísio, ambos presentes em concentrações maiores no epi - e perimísio que no endomísio. Laminina e colágeno IV estão presentes no local de contato da lâmina basal com o perimísio, mas ausentes no perimísio e endomísio propriamente ditos.

Plasticidade do Músculo Esquelético

O músculo esquelético possui uma alta plasticidade, podendo alterar sua matriz extracelular e as características morfológicas, metabólicas, contráteis e funcionais de suas fibras musculares em diversas patologias. A insuficiência cardíaca é uma dessas condições patológicas que induz adaptações qualitativas e quantitativas nas propriedades do músculo esquelético.

Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) constitui uma importante patologia devido à gravidade de suas manifestações e à sua prevalência. Dados obtidos nos Estados Unidos e na Europa mostram que a incidência média de IC é de 1 a 5 casos por 1000 habitantes/ano, e sua prevalência é de aproximadamente 1% a 2% da população (Givertz, *et al.*, 2005). No Brasil, conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a IC encontra-se entre as principais causas de internação do Sistema Único de Saúde (Albanesi Filho, 2005).

A IC é um estado fisiopatológico no qual o coração é incapaz de bombear sangue de acordo com as necessidades metabólicas teciduais, ou pode fazê-lo adequadamente às custas da elevação da pressão de enchimento ventricular (Givertz, *et al.*, 2005). De acordo com Cohn, (1988), a IC é uma síndrome clínica associada à disfunção cardíaca, diminuição da expectativa de vida e intolerância aos exercícios físicos. Essa intolerância aos exercícios físicos, bem como a redução da atividade locomotora, estão associados aos principais sintomas dos pacientes com IC: a fadiga e a fraqueza muscular (Wilson, *et al.*, 1993; Poole-Wilson & Ferrari, 1996; Wilson, 1996; Bigard, *et al.*, 1998).

Alterações nas Fibras do Músculo Esquelético na IC

Embora vários fatores tenham sido descritos como responsáveis pelo desenvolvimento de fadiga e fraqueza muscular, a sua etiopatogenia ainda não está completamente esclarecida. Esse fenômeno é decorrente, em parte, da mudança no metabolismo de oxidativo para glicolítico (Bernocchi, *et al.*, 1996) e da presença de alterações nos tipos de fibras musculares (Lipkin, *et al.*, 1988; Sullivan, *et al.*, 1990; Mancini, *et al.*, 1992; De Sousa, *et al.*, 2000; Carvalho, *et al.*, 2003). A IC induz a expressão da isoforma de cadeia pesada de miosina (MHC) em direção a isoforma rápida (Simonini, *et al.* 1996; Bigard, *et al.*, 1998; Vescovo, *et al.*, 1998; Carvalho, *et al.*, 2003), a qual está relacionada com a severidade da IC (Vescovo, *et al.*, 1996; Spangenburg, *et al.*, 2002). Dados do nosso laboratório também demonstraram mudanças na composição das isoformas da miosina e na proporção dos tipos de fibras durante a transição de hipertrofia ventricular para IC (Carvalho, *et al.*, 2003).

Mecanismos Responsáveis pelas Mudanças dos Tipos de Fibras Musculares na Insuficiência Cardíaca

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na composição das isoformas da miosina no músculo esquelético na IC não estão completamente definidos. É provável que os fatores de transcrição pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4, conhecidos como fatores de regulação miogênica, sejam responsáveis pelas mudanças nos tipos de fibras. Como descrito anteriormente, na miogênese, esses fatores transcricionais músculo-específicos regulam a ativação, proliferação e diferenciação de células miogênicas. A MyoD e a Myf5 são expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, enquanto que a Miogenina e o MRF4 são expressos em células no final da fase de diferenciação (Megney & Rudnicki, 1995). Esses fatores ligam-se a seqüências de DNA (5´-CANNTG-3´), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, levando à expressão dos mesmos (Murre, *et al.*, 1989; Lassar, *et al.*, 1991).

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

Há poucas informações na literatura a respeito do papel dos fatores de regulação miogênica na transição das isoformas de cadeia pesada de miosina que ocorre nos portadores de insuficiência cardíaca. A primeira hipótese deste trabalho é que a transição das isoformas de cadeia pesada de miosina, de lenta para rápida, que existe na IC, é devida às mudanças na expressão dos fatores de regulação miogênica.

Alterações da Matriz Extracelular do Músculo Esquelético na IC

Outro fator responsabilizado pelo desenvolvimento de fadiga e fraqueza muscular na IC é a presença de atrofia da musculatura esquelética, observada em diferentes modelos animais (Simonini, *et al.*, 1996; De Souza, *et al.*, 2000; Vescovo, *et al.*, 1998; Dalla Libera, *et al.*, 1999; Carvalho, *et al.*, 2003; Carvalho, *et al.*, 2005) e em pacientes com essa síndrome (Mancini, *et al.*, 1992; Harrington, *et al.*, 1997; Toth, *et al.*, 1997; Poehlman, 1999; Anker, *et al.*, 2003). A atrofia da musculatura esquelética na IC é acompanhada por alterações na matriz extracelular adjacente às fibras musculares e envolve, principalmente, apoptose de células intersticiais (Vescovo, *et al.*, 1998; Dalla Libera, *et al.*, 1999; Vescovo, *et al.*, 2000), aumento no conteúdo de colágeno (Filippatos, *et al.*, 2003) e da atividade de metaloproteinases (MMPs) (Schiotz Thorud, *et al.*, 2005). Porém, tem sido aventado que, no músculo esquelético, a apoptose mionuclear pode não resultar em imediata morte da fibra muscular, pois a proliferação de células satélites poderia contrabalancear a morte dos núcleos e disfarçar a perda de massa muscular (Vescovo, *et al.*, 1998).

Células-satélites são mioblastos quiescentes localizados entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (Isgaard, *et al.*, 1999). Geralmente, são inativas no adulto, mas são capazes de proliferar e se diferenciar para a reposição de núcleos nas fibras musculares nos processos de degeneração, bem como contribuir para o crescimento muscular (Mauro, 1961; Maison, *et al.*, 2003).

Vários fatores estão envolvidos com recrutamento de células-satélite, dentre eles o hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-1) ou somatomedina C (Adams, *et al.*, 1999).

Alteração Neurohormonal

Alteração no eixo GH/IGF-1 podem ter papel na miopatia associada à insuficiência cardíaca. O GH é secretado na pituitária anterior; seus principais efeitos metabólico são mediados pela ativação de somatomedinas, principalmente o IGF-1. Recentes estudos têm identificado o IGF-1 como um importante regulador de vias anabólicas e do crescimento muscular (Schulze, 2005). Na insuficiência cardíaca crônica, parece haver um estado de resistência ao GH, caracterizado por aumento de sua concentração e redução nos níveis de IGF-1 (Niebauer, *et al.*, 1998). Pacientes com insuficiência cardíaca e deficiência de IGF-1 apresentam redução na área seccional da fibra e da força muscular quando comparados a doentes sem insuficiência cardíaca e níveis normais de IGF-1 (Niebauer, *et al.*, 1998). Em ratos com insuficiência cardíaca, a administração de altas doses de GH promoveu a normalização da força e massa muscular, bem como, a diminuição dos níveis séricos de TNF-alfa e de apoptose em músculos esqueléticos (Dalla Libera, *et al.*, 2004). Apesar destes estudos realizados, não está bem esclarecido qual o papel do GH na manutenção da massa muscular na IC. A hipótese do nosso trabalho é que a administração de GH em ratos com IC pode levar a mudança no padrão de expressão dos fatores que controlam o fenótipo muscular, prevenindo as alterações no músculo esquelético.

II - OBJETIVO

Avaliar o efeito do GH sobre a morfometria e a expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica.

III – METODOLOGIA

Animais e Protocolo Experimental

Esse estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), e no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IB), UNESP.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 3 semanas e peso corporal de 70 a 80g, provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas, 1 rato/caixa, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12h e foram alimentados durante todo o período experimental com ração Labina e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Indução da Insuficiência Cardíaca por EAo

Para a indução da estenose aórtica (EAo), cerca de 35 ratos foram submetidos à tricotomia e toracotomia mediana, após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/Kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/Kg intramuscular). A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, e colocado a aproximadamente 3 mm de sua raiz. Durante a cirurgia, os ratos receberam ventilação manual a pressão positiva e 1 ml de soro fisiológico aquecido, intraperitonealmente (Figura 7). Os animais foram mantidos em gaiolas, com quatro ratos cada, à temperatura de 23°C e com ciclos de luminosidade de 12h, no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica – FMB – UNESP – Botucatu. Os ratos receberam ração e água *ad libitum* (Gonçalves, *et al.*, 2005; Carvalho, *et al.*, 2003).

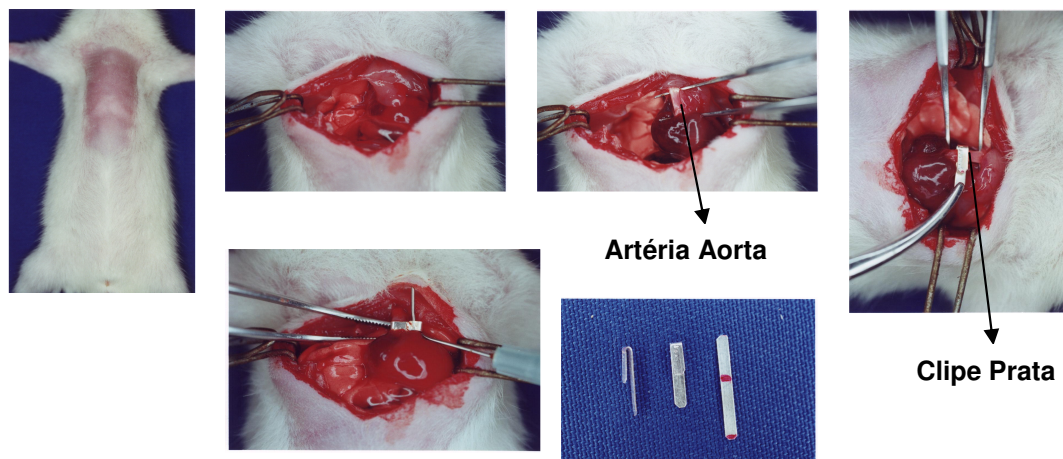


Figura 7. Cirurgia para a indução da Estenose Aórtica (Gonçalves, *et al.*, 2005; Carvalho, *et al.*, 2003).

Avaliação Estrutural e Funcional do Coração pelo Ecocardiograma (ECO)

Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg), administrados por via intraperitoneal, quando apresentaram taquipnéia, que sugere uma disfunção ventricular na fase de hipertrofia compensada, caracterizando o estágio de remodelação cardíaca, que foi observado em média na 25 semana pós indução de estenose aórtica. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando-se o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (Isgaard, *et al.*, 1997; Tivesten, *et al.*, 2001). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas em modo-M foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro de precisão. Os

valores das medidas das estruturas cardíacas representam a média aritmética de pelo menos 5 ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE foi medido no momento do ciclo cardíaco em que seu valor máximo e mínimo, respectivamente. As espessuras diastólicas e sistólicas da parede posterior (EDPP e ESPP) e do septo interventricular (EDSIV e ESSIV) foram medidas no momento em que a cavidade ventricular esquerda apresentava diâmetro máximo e mínimo, respectivamente. A medida da raiz da aorta (AO) foi realizada no instante imediatamente anterior à abertura da valva aórtica. O átrio esquerdo (AE) foi medido no momento em que seu diâmetro era máximo. A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada pela porcentagem de encurtamento sistólico (diâmetro diastólico /diâmetro sistólico)/diâmetro diastólico) e pela velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo. A função diastólica do VE foi avaliada pela razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral. A avaliação da disfunção diastólica e sistólica também foi baseada na relação do diâmetro do átrio esquerdo relativamente ao peso corporal (PC). A hipertrofia ventricular esquerda foi avaliada pelo índice de massa ventricular esquerda e pela relação do diâmetro diastólico do VE relativamente ao PC.

As variáveis derivadas das dimensões acima descritas foram:

- espessura relativa do VE= EDPP/DDVE
- massa do VE (MVE, g)= $1,04 \times [(EDPP+EDSIV+DDVE)^3 - DDVE^3]$, onde 1,04 é a densidade específica do miocárdio.
- índice de MVE (IMVE, g/kg)= MVE/peso corporal
- porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. Endo.)= $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$
- porcentagem de encurtamento miocárdico (% enc. Mio.)= $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP) - (DSVE + \frac{1}{2} ESSIV + \frac{1}{2} ESPP)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDSIV + \frac{1}{2} EDPP)\} \times 100$.
- velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP, mm/s): calculada a partir da tangente máxima do movimento sistólico do endocárdio da parede posterior do VE.

Critério para Seleção dos Animais

Os resultados ecocardiográficos foram utilizados para o cálculo da função discriminante e classificação do estágio da remodelação cardíaca. Foi desenvolvida uma função discriminante, pela técnica de Fisher, utilizando-se, simultaneamente, cinco variáveis, que mais discriminaram os grupos controle, estenose aórtica leve e moderada-grave ($p < 0,001$): AE/PC, IMVE, VEPP, % Enc endocárdico e miocárdico.

A partir destas variáveis discriminatórias utilizou-se a técnica da discriminação gráfica de Fisher, pela construção das regras de classificação de novos animais nos grupos de estudo. Esta técnica constituiu em definir funções lineares utilizando-se variáveis ecocardiográficas, que em número de duas representaram os eixos discriminantes para os grupos. O primeiro eixo (horizontal) do plano cartesiano refere-se ao detentor da maior quantidade de informação biológica para a discriminação, enquanto o segundo (vertical), a segunda maior quantidade. A soma das duas quantidades indica total de informação biológica contida no processo gráfico de discriminação.

A função discriminante possibilitou diferenciar três grupos funcionais, mediante a análise concomitante das 5 (cinco) variáveis, com precisão de 99,9%: controle, EAo leve e EAo grave.

A fórmula utilizada para a função para a definição dos valores dos eixos foi:

Primeiro eixo (horizontal);

$$X1 = 0,188437 * AE/PC - 0,216861 * \%enc.endo - 0,656054 * \%enc.médio - 1,486010 * IMVE - 0,326327 * VEPP$$

Segundo eixo (vertical);

$$X2 = 0,469914 * AE/PC + 1,106150 * \%enc.endo - 0,687396 * \%enc.médio + 11,099200 * IMVE - 0,498903 * VEPP$$

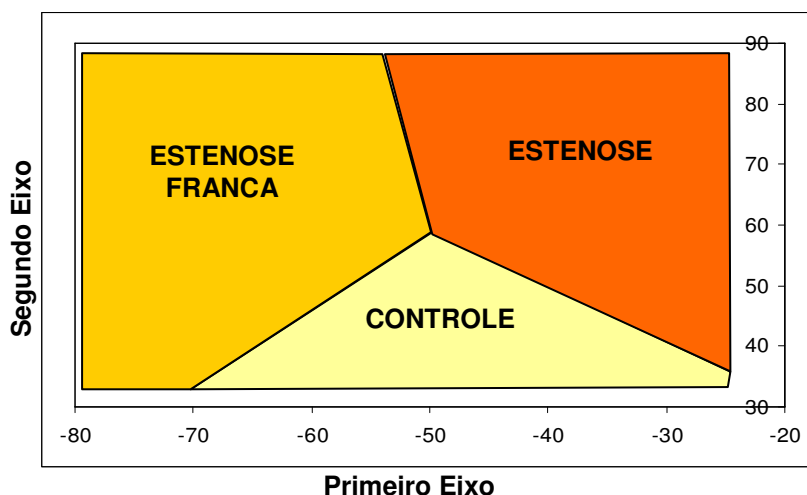


Figura 8. Regiões Gráficas de Fisher para a Discriminação da Disfunção Cardíaca.

A alocação de um novo animal foi realizada pelos valores numéricos obtidos nas duas funções representadas no plano cartesiano dos eixos discriminadores, cujo indicativo do mais provável, correspondeu à região de pertinência do valor, a partir do qual selecionamos os animais do Grupo EA grave, conforme descrito anteriormente.

Os animais que, inicialmente, não se enquadraram nessa classificação foram submetidos à realização de novo(s) ecocardiograma(s), até atingirem estágio mais grave, quando então foram incluídos no estudo.

Grupos Experimentais

Após a avaliação da função cardíaca pelo ECO e sua classificação pela função discriminante de Fisher, os animais com EAo classificados como com insuficiência cardíaca grave, foram submetidos ou não ao tratamento com hormônio de crescimento (GH).

Foram utilizados 21 animais, distribuídos em 3 grupos:

G1 – Grupo Controle (n=7)

G2 – Grupo EAo (n=7)

G3 – Grupo EAo+GH (n=7)

Foi administrada a dose de 2 mg/kg/dia, por via subcutânea, durante duas semanas, período que não promove o desenvolvimento de anticorpos anti-GH humano em animais (Iimoto, *et al.*, 1998).

Sacrifício dos Animais e Coleta do Material de Estudo

Análise Morfológica

Os músculos sóleos direito e esquerdo foram dissecados e retirados. O músculo sóleo direito foi pesado e amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em Freezer a -80°C para posterior análise.

Cortes histológicos com $8\ \mu\text{m}$ foram obtidos em micrótomo criostato a -20°C e submetidos à coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE), para a análise da morfologia geral das fibras musculares e Picosírios-red, para a análise da distribuição do colágeno no músculo.

As lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina foram utilizadas para o cálculo da área das fibras musculares. Foram mensuradas as áreas de perfis de fibras em 5 campos em cada animal, utilizando-se um Sistema para Análise de Imagens Computadorizado. Todas as fibras inteiras do campo foram mensuradas.

As lâminas coradas com Picosírios-red foram utilizadas para a mensuração da área ocupada pelo colágeno no músculo. Foram mensuradas as áreas em 5 campos em cada animal, utilizando-se um Sistema para Análise de Imagens Computadorizado.

Avaliação Hormonal

Foi realizada a dosagem das concentrações séricas de IGF-1. O sangue foi coletado após 12 horas da última injeção com GH, em todos os grupos analisados. Após a retirada, o sangue foi centrifugado a 4°C e amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80°C para processamento e análise.

As dosagens foram feitas no mesmo ensaio, em duplicata, utilizando-se a metodologia de RIE (Kit comercial Mouse/rat IGF-1 RIA Referência: DSL 2900 –Diagnostic Systems Laboratories Inc.).

Avaliação da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica da família bHLH por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT - PCR).

1. Extração de RNA com TRIzol.

No momento da extração de RNA, fragmentos do músculo sóleo esquerdo congelado em nitrogênio líquido foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e as células em cultura dissociadas com TRIzol (1 mL de TRIzol/3,5 cm do diâmetro das placa). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente para permitir à completa dissociação dos complexos núcleos - protéicos. Após esse período, foi acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente, e incubando novamente, desta vez por 3 minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0.5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) gelado e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento de RNA formado foi seco em centrífuga a vácuo, ressuspenso em solução de 0.5% preparada com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), incubando a 60 °C por 10 min para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase. O RNA foi então quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA. Foi também determinada a razão entre 260 e 280 nm, o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão ≥ 1.65).

Foi procedida então a eletroforese (25 µg de RNA total) em gel de agarose (1%)/formaldeído, em tampão Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM (TBE) 1X uma voltagem de 70 mV para analisar a integridade do RNA.

2. Gel analítico de agarose para RNA

Foram dissolvidos 0.25 mg de agarose, por aquecimento, em 25 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7.0, resfriado a 50 °C e despejados sobre uma cuba com poços de aplicação. A espessura do gel foi de aproximadamente 5 mm. A preparação permanece à temperatura ambiente por 45 minutos.

Nesse intervalo de tempo, a amostra foi preparada desnaturando 3 µl de RNA com uma mistura de glioxal, DMSO e tampão fosfato 100 mM, pH 7.0, por 15 minutos a 50 °C. A seguir foi adicionado 3 µl de tampão de aplicação, e a amostra foi aplicada no gel.

A eletroforese foi realizada na corrente constante de 40 mA por aproximadamente 45 minutos, sob agitação do tampão fosfato 10 mM, pH 7.0, para manutenção do pH. Terminada a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de laranja de acridina 30 µg/mL por alguns segundos e descorado em H₂O MilliQ.

O gel foi colocado sobre o Foto UV 450 DNA Transilluminator, da Fotodyne Incorporated que, corado com laranja de acridina, para que o RNA seja visualizado e fotografado, com filme de revelação instantânea 677, da Polaroid. O DNA digerido com a enzima de restrição Hind III foi usado como padrão de comparação de peso molecular.

3. Primers

Os oligonucleotídeos que foram utilizados como primers (iniciadores) para a reação de polimerase em cadeia do produto de transcrição reversa, do RNA total extraído do músculo esquelético, dos fatores de transcrição miogênica foram: MyoD, como descrito por Smith, et al., 1994 e Miogenina, como descrito por Hsu, et al., 1997. Para controle interno, foi utilizada a ciclofilina.

Produto	Acesso N°	Seqüência	Início	Temp. °C	Ciclos	PCR Peso, bp
MyoD	M84176	5' GACGGCTCTCTCTGCT CCTT 3' GTCTGAGTCGCCGCTG TAGT	259 782	60	34	544
Myogenina	M24393	5' TGCCACAAGCCAGACT ACCCACC 3' CGGGGCACTCACTGTC TCTCAA	827 1050	63	34	246
Ciclofilina	M19533	5' ACGCCGCTGTCTCTT T TC 3' TGCCTTCTTTACCTT CC	9 431	57.7	32	440

Tabela 1. Oligonucleotídeos que foram utilizados como primers para PCR do produto de transcrição reversa RNA.

Os primers foram sintetizados comercialmente e ressuspensos em 200µl de água autoclavada. Após a avaliação da DO 260 nm, os primers foram diluídos para uma concentração final de 30 pMol/µl para os fatores transcripcionais e 20 pMol/µl para o RPL 19.

4. RT-PCR

A transcrição reversa do RNA total obtido do músculo esquelético foi realizada incubando-se, por 5 minutos a 75°C, alíquotas contendo 1,5 µg de RNA total ao qual foi adicionado; 1 µl de Ramdon Primers e 13 µl de H₂O com DEPC (dietil pirocarbonato) por amostra. Em seguida, foi adicionado 11 µl de uma mistura composta de 4 µl de água DEPC, 5 µl de tampão de transcriptase reversa (MMLV reverse transcriptase 5X buffer), 1,3 µl de dNTPs 10 mM, 0.625 µl de RNA Inhibitor (inibidor de RNAses), 1 µl de enzima de transcriptase reversa. A mistura foi incubada a 42°C durante uma hora, seguida de um período de 15 minutos a 75°C.

Alíquotas de 3 µl da reação de RT foram adicionadas a 47 µl de uma mistura contendo 38 µl de água autoclavada, 5 µl de tampão 10X Taq polimerase, 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de primers senso e antiseno (10 pmol) e 0.35 de Taq polimerase por amostra. O controle interno (RPL 19) foi adicionado no início do quinto ciclo, uma vez que o número de ciclos para

esses primers é 24, enquanto que o número de ciclo para os fatores transcricionais é 30.

O ciclo utilizado a cada jogo de primers foram 34 de 95°C, 45 seg; anelamento da MyoD, 53°C e da Miogenina, 60°C , por 30 seg; 72 °C, 1 min, e uma extensão final de 10 minutos.

Ao final dos ciclos, 5 µl do produto da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TBE (1x) e corados com brometo de etídeo.

As bandas referentes à amplificação dos fatores transcricionais e do controle interno foram visualizadas em transiluminados, fotografadas e analisadas densitometricamente.

IV – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com técnica de variância para o modelo com um fator, complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey (Norman & Streiner, 1994). Para análise das variáveis ecocardiográficas utilizou análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes – Análise dos perfis médios de resposta (Johnson & Wichern, 1998). Foi considerado o nível de significância de 5%.

V - RESULTADOS

O peso dos animais foi semelhante entre os grupos estudados. As variáveis morfológicas VD/PC e VE/PC apresentaram valores maiores no grupo EAo ou não com EAo+GH, em relação ao C e valores semelhantes nos grupos EAo e EAo+GH. A variável Psóleo/PC apresentou-se igual em todos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Dados anatômicos (média±DP) dos animais tratados com EAo+GH ou EAo (2 mg/kg/dia), durante 14 dias.

	C	EAo	EAo+GH
Peso Corporal (g)			
Antes do tratamento	572,86±86,76	567,00±71,99	544,17±52,95
Pós-tratamento	545,86±75,43	546,00±54,17	538,33±40,97
VE/PC (mg/gr)	1,70±0,10 a	3,36±0,99 b	2,82±0,20 b
VD/PC(mg/gr)	0,54±0,11 a	1,19±0,29 c	0,85±0,23 b
Psóleo/PC(mg/gr)	0,51±0,08	0,48±0,05	0,53±0,09

C, controle + placebo; EAo, estenose aórtica + placebo; EAo+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento; A/PC, átrios corrigido pelo peso corporal; VE/PC, ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal; VD/PC, ventrículo direito corrigido pelo peso corporal; Psóleo/PC, peso do músculo sóleo corrigido pelo peso corporal. Letras representam a diferença estatística entre os grupos. Ausência das letras: não há diferença estatística.

No nosso estudo, a presença de IC foi confirmada, no sacrifício dos ratos, pelo encontro de derrame pleural, ascite, trombo no átrio direito e hipertrofia do ventrículo direito (Feldman, *et al.*, 1993; Carvalho, *et al.*, 2003). No decorrer do período experimental, 2 animais do grupo EAo e 1 animal do grupo EAo+GH morreram.

A análise morfológica do músculo sóleo mostrou fibras musculares com aspecto normal em todos os grupos estudados (Figura 9). A área das fibras do músculo sóleo foi significativamente menor no grupo EAo em relação ao C. No grupo EAo+GH observou-se aumento significativo na área das fibras em relação ao grupo EAo, não havendo diferença significativa entre os grupo C e EAo+GH (Tabela 3).

A área do músculo sóleo ocupada pelo colágeno apresentou-se significativamente maior no grupo EAo e EAo+GH, em relação ao C. Porém no

grupo EAo+GH houve redução significativa (20,9%) da área de colágeno no músculo em relação ao grupo EAo (Figura 9 e Tabela 3).

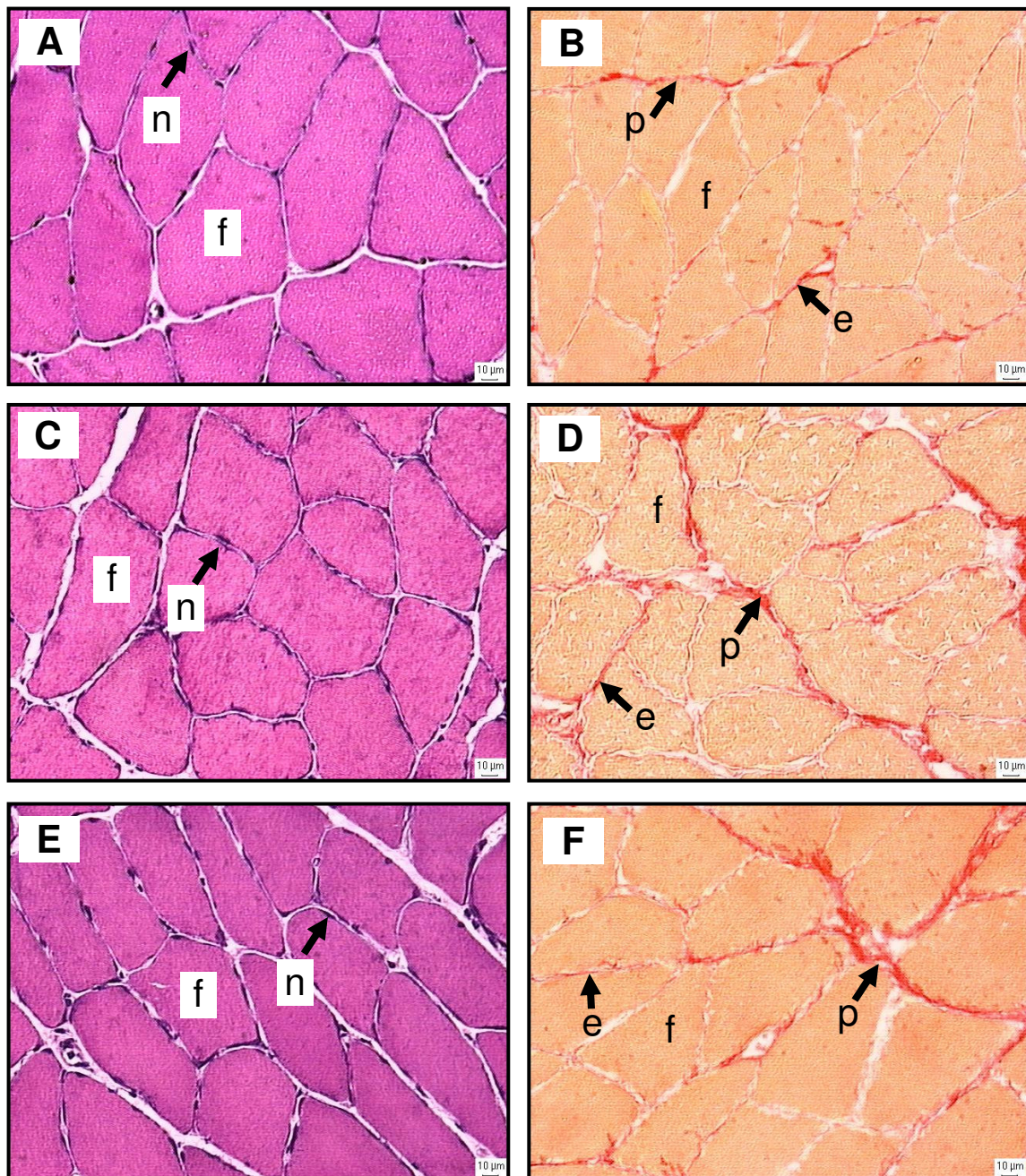


Figura 9. Corte transversal do músculo sóleo. **A e B:** Grupo Controle (**C**). **C e D:** Grupo Estenose aórtica (EAo). **E e F:** Grupo Estenose aórtica + Hormônio de Crescimento (EAo+GH). Fibras musculares (f). Núcleo das fibras musculares (n). Tecido conjuntivo do Endomísio (e) e Perimísio (p) em B, D e F.

Os níveis de IGF-1 no soro apresentaram-se diminuídos no grupo EAo quando comparados com o grupo C. No grupo EAo+GH, esses níveis hormonais foram semelhantes ao grupo EAo (Tabela 3).

Tabela 3. Dados referentes à Área das fibras musculares (AST), Área ocupada por Colágeno (Col), e dosagem do IGF (ng/ml) – Basal. Dados representados como média±DP.

	C	EAo	EAo+GH
AST	3302,90±131,57 b	2880,90±148,76 a	3548,52±264,05 b
Col	2711,46±850,94 a	4175,24±254,47 b	3376,02±478,23ab
IGF-1 (ng/ml)	2176,80±447,19 b	1287,64±496,06 a	1662,33±602,54 ab

C, controle + placebo; EAo, estenose aórtica + placebo; EAo+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento. IGF-1, fator de crescimento insulina-símile, tipo 1. Letras representam a diferença estatística entre os grupos. Ausência das letras: não há diferença estatística.

Em relação às variáveis ecocardiográficas estudadas, verificou-se nos grupos EAo e EAo+GH apresentou aumento de AE/PC e de IMVE comparativamente ao grupo C. Os grupos EAo e EAo+GH apresentaram VEPP significativamente menor em relação ao grupo C. Não houve diferença entre % enc. endo, % enc. Mio, entre os 3 grupos. Não foi possível detectar-se diferenças entre os valores de E/A entre os 3 grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis ecocardiográficas (média±DP) dos animais tratados com GH ou PL na dose de 2 mg/kg/dia, durante 14 dias.

	C	EAO	EAO+GH
AE/PC(mm/kg)			
Inicial	10,06±1,39 a	14,61±1,26 b	15,50±1,76 b
Pós-tratamento	12,47±3,27a	16,33±2,12 b	15,70±2,18 b
% Enc. Endo			
Inicial	52,44±2,75	48,55±3,50	46,30±8,62
Pós-tratamento	51,29±8,89	47,27±4,71	49,11±15,10
% Enc. Mio			
Inicial	31,66±2,03	28,95±2,31	27,39±4,89
Pós-tratamento	32,17±5,48	28,70±1,83	31,29±8,12
VEPP(mm/seg)			
Inicial	40,77±4,36 b	31,09±0,90 a	30,70±6,82 a
Pós-tratamento	43,08±7,79 b	31,24±6,77 a	30,51±8,62 a
IMVE (g)			
Inicial	1,90±0,15 a	3,11±0,44 b	2,94±0,47 b
Pós-tratamento	2,02±0,27 a	3,33±0,60 b	3,41±0,61 b

C, controle + placebo; EAO, estenose aórtica + placebo; EAO+GH, estenose aórtica + hormônio de crescimento; AE/PC, átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; % Enc. Endo, % de encurtamento endocárdico; % Enc. Mio, % de encurtamento miocárdico; VEPP, velocidade de encurtamento da parede posterior; IMVE, índice de massa de ventrículo esquerdo. Letras representam a diferença estatística entre os grupos. Ausência das letras: não há diferença estatística.

Os resultados referentes à expressão gênica da miogenina e MyoD foram obtidos em duplicata em géis diferentes para cada gene, e os resultados finais foram calculados pela média dos géis. Para a detecção das diferenças relativas na integridade das amostras de RNA dos genes alvo, 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.

A expressão gênica da miogenina foi semelhante entre os grupos estudados (Figura 10A), porém a expressão gênica da MyoD aumentou significativamente no grupo EAO+GH em relação ao EAO, porém, esse aumento não foi significativo quando comparado ao grupo C (Figura 10B).

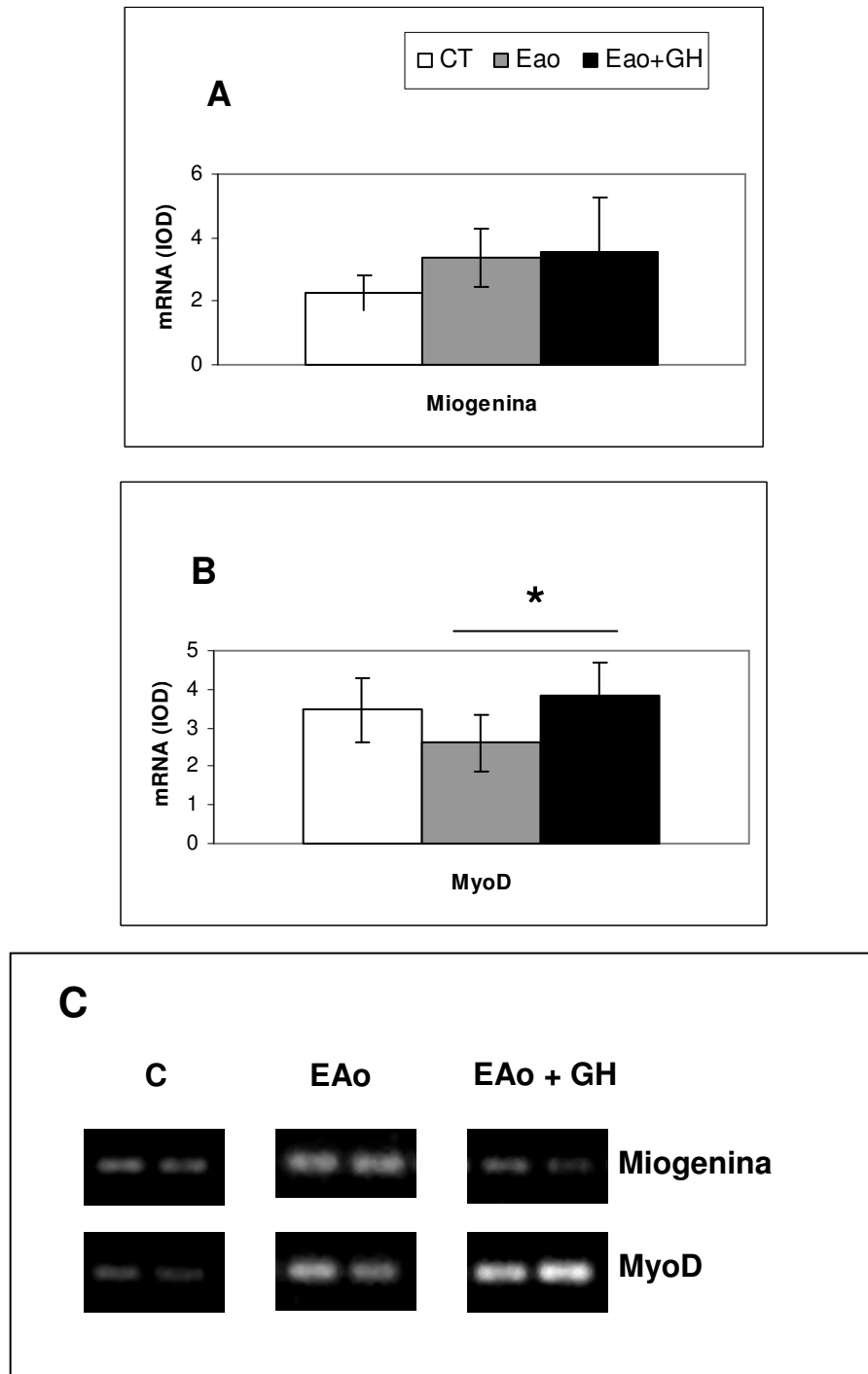


Figura 10. Expressão gênica dos MRFs Miogenina (A) e MyoD (B) no músculo sóleo dos grupos Controle (C), Estenose Aórtica + Placebo (EAO) e Estenose Aórtica + GH (EAO+GH). A expressão gênica da Miogenina e MyoD foi normalizada pelo gene constitutivo ciclofilina. (C) Esquema representativo dos géis da miogenina e MyoD obtido do produto de PCR. Dados normalizados expressos em média \pm desvio padrão. * Dados estatisticamente significativos. $p < 0.05$.

VI - DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisamos o efeito da administração GH sobre o músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica. No decorrer do estudo, 1 animal do grupo EAo, e 2 animais do grupo EAo+GH morreram. A mortalidade dos animais nesse modelo experimental ocorre principalmente devido à arritmias, isquemia subendocárdica e alterações da circulação coronariana (Litwin, *et al.*, 1995; Bregagnollo, *et al.*, 2005). No nosso estudo, os indicadores ecocardiográficos (IMVE) e anatômicos (VE e VE/PC) mostraram-se aumentados no grupo EAo indicando possível hipertrofia cardíaca com a progressão dos estágios da remodelação cardíaca, havendo piora na estrutura e função do miocárdio. Esses dados, associados aos achados clínicos, como taquipnéia, derrame pleural, ascite, trombo no átrio esquerdo e hipertrofia ventricular direita, confirmaram que os animais estavam em insuficiência cardíaca (Remme, 2003; Browh, *et al.*, 2005; Burlew & Weber, 2002; González, 2004). Após o tratamento com GH não houve alterações entre as variáveis, demonstrando que o GH não alterou as condições morfofuncionais no músculo cardíaco dos ratos submetidos à sobrecarga pressórica tratados com GH em relação ao EAo. A ausência de melhoria funcional pode ser secundária à má qualidade funcional dos cardiomiócitos, nessa fase da remodelação cardíaca, corroborando o que foi mostrado em estudos em modelos de miocardiopatia isquêmica (Cittadini, *et al.*, 1997; Litwin, *et al.*, 1995; Duerr *et al.*, 1995). No entanto, alguns trabalhos indicam uma diminuição de fibrose no miocárdio em ratos com IC induzida por EAo, após tratamento com GH em até 56,9%, comparado ao grupo EAo (Moreira, 2006). Esse fato pode atenuar a ocorrência de arritmias e morte súbita e melhorar o prognóstico (Remme, 2003; Browh, *et al.*, 2005; Frohlich, 2000).

No nosso estudo, a análise morfológica foi realizada no músculo sóleo, tendo em vista que outros estudos mostraram que este músculo apresenta alterações na insuficiência cardíaca aguda (Carvalho, *et al.*, 2006) e crônica (Carvalho, *et al.*, 2003, Martinez, 2008). Os animais do grupo EAo mostraram atrofia das fibras musculares quando comparada com os animais do Grupo C. No grupo EAo+GH houve aumento significativo na área das fibras em relação

ao grupo EAo, porém não houve diferença significativa entre os grupo C e EAo+GH com e após a administração do GH. A atrofia das fibras musculares na IC tem sido comumente observada tanto em estudos clínicos (Sullivan, *et al.*, 1990; Mancini, *et al.*, 1992; Anker, *et al.*, 1999), como em trabalhos experimentais (Delp, *et al.*, 1997; Carvalho, *et al.*, 2003; Schulze, *et al.*, 2003; Dalla Libera, *et al.*, 2004). No entanto, a atrofia é dependente do modelo utilizado bem como do tipo de músculo analisado. No modelo de IC induzida por monocrotalina, droga que induz severa hipertensão arterial pulmonar seguida de hipertensão ventricular direita e insuficiência cardíaca aguda (Reindel, *et al.*, 1990; Vescovo, *et al.*, 1998), não foi observada atrofia no músculo sóleo (Carvalho, *et al.*, 2006) e diafragma (Lopes, *et al.*, 2008), porém o músculo EDL apresentou atrofia (dados não publicados). Já, Martinez, 2008 observou atrofia no músculo sóleo em ratos com IC induzida por infarto (Zornoff, *et al.*, 2000). Alguns fatores parecem estar envolvidos na atrofia muscular, como redução da atividade física e neuromuscular, ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanham o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Dalla Libera, *et al.*, 2001; Fillipatos, *et al.*, 2005; Toth, *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado que a atrofia da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca também pode ser induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) (Beutler, *et al.*, 1985; Tisdale, 1997; Argiles & Lopez-Soriano, 1999), citocina envolvida com a ativação de fatores transcricionais envolvidos em vários processos celulares como apoptose, imunidade e inflamação, e desenvolvimento/diferenciação (para uma revisão Baldwin, 1996); também pode ocorrer pelo aumento da miostatina (McPherron, *et al.*, 1997; Lee, 2004) e pela ativação do sistema ubiquitina-proteossoma (Schulze, *et al.*, 2005). De fato, em nosso laboratório, demonstramos um aumento de três componentes do sistema proteossomal dependente de ubiquitina: MuRF1, MAFbx e ubiquitina, em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela monocrotalina (dados não publicados), o que mostra o possível envolvimento desta via no processo de atrofia da musculatura.

O aumento na área das fibras musculares nos animais que receberam GH demonstra o efeito anabólico do hormônio no músculo sóleo. O grau de

envolvimento do hormônio com essa resposta muscular não está esclarecido, porém, parece que o GH pode atuar diretamente no músculo ou através do IGF-1. No nosso estudo, o nível de IGF-1 no plasma aumentou no grupo EAo+GH o que reforça a hipótese do seu envolvimento no processo de hipertrofia muscular.

O mecanismo pelo qual o IGF-1 pode evitar a atrofia muscular na insuficiência cardíaca é controverso. Pode impedir a morte celular por apoptose, conforme demonstrado por Dalla Libera (2004) e/ou estimular a hipertrofia das fibras musculares. Em ratos mdx, propensos a desenvolver apoptose e atrofia muscular, foi demonstrado que o IGF-1 pode ativar os mecanismos envolvidos com a manutenção das fibras musculares impedindo a morte celular (atrofia) restaurando assim, a função muscular (Barton, *et al.*, 2002).

Por outro lado, IGF-1 pode atenuar a perda de massa muscular diminuindo a atividade do sistema proteossomal dependente de ubiquitina (Mitch, *et al.*, 1999, Dehoux, *et al.*, 2004) através da via do fosfatidylinositol 3 kinase (PI3K) (Kandarian & Jackman, 2006). Embora no nosso estudo não avaliamos os componentes das vias envolvidas com a atrofia e/ou hipertrofia muscular, é possível que o IGF-1 tenha atuado desta forma no grupo com insuficiência cardíaca que recebeu GH.

A área do músculo sóleo ocupada pelo colágeno foi significativamente maior no grupo EAo, em relação ao C. No grupo EAo+GH houve redução da área de colágeno no músculo em relação ao grupo EAo, embora não estatisticamente significativa. Na IC, a atrofia da musculatura esquelética é acompanhada por alterações na matriz extracelular adjacente às fibras musculares e envolve, principalmente, a apoptose de células intersticiais (Vescovo, *et al.*, 1998; Dalla Libera, *et al.*, 1999; Vescovo, *et al.*, 2000), aumento no conteúdo de colágeno (Filippatos, *et al.*, 2003) e da atividade de metaloproteinases (MMPs) (Schiotz Thorud, *et al.*, 2005; Carvalho, *et al.*, 2006). Desta forma, a ausência de atrofia do músculo sóleo quando da análise do peso do músculo corrigido pelo peso corporal nos grupos do nosso experimento confirmou que a atrofia do músculo sóleo é acompanhada do aumento do tecido conjuntivo do perimísio e do endomísio.

No nosso estudo, a expressão gênica do MRF MyoD diminuiu no grupo EAo, aumentou significativamente no grupo Eao+GH em relação ao EAo, porém, esse aumento não foi significativo quando comparado ao grupo C. Já, a expressão gênica do MRF miogenina foi semelhante entre os grupos estudados.

Os MRFs são fatores transcripcionais pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4. Esses fatores ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como Ebox, presentes na região promotora de vários genes músculo específicos, levando à expressão dos mesmos (Murre, *et al.*, 1989; Lassar, *et al.*, 1991). A MyoD e Myf5 são expressos em mioblastos na fase de proliferação, enquanto que a Miogenina e o MRF4 são expressos em células no final da fase de diferenciação (Megenev & Rudnicki, 1995).

Na fibra muscular adulta, a Miogenina e a MyoD também podem estar envolvidos na manutenção do seu fenótipo, rápido ou lento; a Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (Hughes, *et al.*, 1993; Voytik, *et al.*, 1993).

A causa da diminuição da expressão do mRNA da MyoD durante a IC não está bem esclarecida, porém, alguns autores apontam o envolvimento de citocinas inflamatórias, como o TNF- α no processo (Anker, *et al.*, 1999). Essa citocina mostrou-se aumentada em pacientes (Levine, *et al.*, 1990; McMurray, *et al.*, 1991) e ratos Sprague-Dawley com insuficiência cardíaca (Dalla Libera, *et al.*, 1999; Dalla Libera, *et al.*, 2001) e há evidências que o TNF- α além de ativar o sistema proteossomal dependente de ubiquitinas (Cai, *et al.*, 2004; Acharyya, *et al.*, 2004), também pode estar envolvido com a diminuição da expressão do RNA mensageiro para a Myod (Guttridge, *et al.*, 2000; Acharyya, *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, o aumento na expressão da MyoD no músculo sóleo dos animais que receberam GH pode ser um indicador de ativação e proliferação das células satélites por estímulo do IGF-1, que aumentou neste grupo. Tem sido demonstrado que o IGF-1 pode promover o aumento da massa muscular induzindo a hipertrofia das fibras musculares (Coleman, *et al.*,

1995), pela ativação das células satélites (Barton-Davis, *et al.*, 1998). Como as células satélites em proliferação expressam MyoD, é possível que a hipertrofia observada no músculo sóleo dos animais com EAo que receberam GH esteja relacionada com o recrutamento e maior atividade deste tipo celular.

A expressão da miogenina não mostrou variação entre os grupos estudados. A miogenina é mais expressa nos músculos lentos (Hughes, *et al.*, 1993; Voytik, *et al.*, 1993), freqüentemente está associada à expressão de enzimas oxidativas e parece ter papel fundamental na caracterização do metabolismo muscular (Hughes, *et al.*, 1999; Ekmark, *et al.*, 2003; Siu, *et al.*, 2004). Apesar de não termos analisado parâmetros metabólicos no nosso estudo, é possível que esses não estejam alterados; no entanto, estudos posteriores serão necessários para melhor avaliar o papel da miogenina na insuficiência cardíaca e em resposta ao GH.

Em conclusão, na insuficiência cardíaca a redução da expressão do fator de regulação miogênica MyoD é acompanhada da atrofia do músculo sóleo e fibrose muscular. O GH promoveu a hipertrofia do músculo sóleo, diminuição da fibrose e aumentou a expressão da MyoD em ratos com insuficiência cardíaca. Esses resultados mostram que o GH pode ser utilizado como terapia coadjuvante para portadores de insuficiência cardíaca crônica.

VII - CONCLUSÃO

Em conclusão, na insuficiência cardíaca a redução da expressão do fator de regulação miogênica MyoD é acompanhada da atrofia do músculo sóleo e fibrose muscular. O GH promoveu a hipertrofia do músculo sóleo, diminuição da fibrose e aumentou a expressão da MyoD em ratos com insuficiência cardíaca. Esses resultados mostram que o GH pode ser utilizado como terapia coadjuvante para portadores de insuficiência cardíaca crônica.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharyya S, et al. (2004) Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Investigation* 114: 370-378.
- Adams GR, Haddad F, Baldwin KM (1999) Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *Appl Physiol* 87: 1705-1712.
- Aigner S, et al. (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates. *Eur J Biochem* 211(1-2):367-372.
- Albanesi Filho FM (2005) What is the current scenario for heart failure in Brazil? *Arq Bras Cardiol* 85(3): 155-156.
- Amthor H, Christ B, Patel K (1999) A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* 126(5): 1041-1053.
- Anker SD, et al. (2003) Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 361(9363): 1077-1083.
- Anker SD, et al. (1999) Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J* 20(9): 683-693.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ (1999) Ubiquitin gene expression is increased in human muscle undergoing neurogenic involvement. *Neurochemistry International* 34(2): 137-40.
- Ashmore CR, Doerr L (1971) Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp Neurol* 31(3): 408-418.
- Bailey AJ, Sims TJ (1977) Meat tenderness: distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *J Sci Food Agric* 28(6): 565-570.
- Baldwin KM, et. al. (1996) Neural influence on slow muscle properties: inactivity with and without cross-reinnervation. *Muscle Nerve* 19(6): 707-14.
- Barton ER, et al. (2002) Muscle-specific expression of insulin growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 157: 137–147.

- Barton-Davis ER, et al. (1998) Viral mediated expression of insulin-like growth factor-1 blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 95: 15603-15607.
- Bayne EK, Anderson MJ, Fambrough DM (1984) Extracellular matrix organization in developing muscle: correlation with acetylcholine receptor aggregates. *J Cell Biol* 99(4 Pt 1): 1486-1501.
- Bernocchi P, et al. (1996) Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28(11): 2263-2273.
- Beutler BA, Milsark IW, Cerami A (1985) Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 135(6): 3972-7.
- Bigard AX, et al. (1998) Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30(11): 2391-2401.
- Biral D, et al. (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem J* 250(1): 307-308.
- Borg TK, Caulfield JB (1980) Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 12(1): 197-207.
- Bregagnollo EA, et al. (2005) Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 84: 225-232.
- Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* 18(9): 670-672.
- Browth RD, et al. (2005) The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual Revision of Pharmacology and Toxicology* 45: 657-687.
- Burlew BS, Weber KT (2002) Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 27(2): 92-98.

- Cai D, et al. (2004) IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119(2): 285-98.
- Caiozzo VJ, et al. (2003) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(3): R570-580.
- Carvalho RF, et al. (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol* 84(4): 201-206.
- Carvalho RF, et al. (2005) Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol*: in press.
- Carvalho R, et. al. (2006) Heart failure alters MyoD and MRF4 expression in rat skeletal muscle. *Int. J. Exp. Pathol*: in press.
- Chargé SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1): 209-238.
- Christ B, Ordahl CP (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 191(5): 381-396.
- Cittadini A, et al. (1997) Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 29(5): 1109-1116.
- Cohn JN (1988) Current therapy of the failing heart. *Circulation* 78(5 Pt 1): 1099-1107.
- Coleman ME, et. al. (1995) Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* 270(33): 12109-12116.
- Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Carvalho RF (2005) Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Eds) *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole, São Paulo: 83-94.
- Dalla Libera L, et al. (2004) Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286(1): C138-144.

- Dalla Libera L, et al. (2001) Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol* 33(10): 1871-1878.
- Dalla Libera L, et al. (1999) Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): C982-C986.
- Dehoux M, et al. (2004) Role of the Insulin-Like Factor I decline in induction of atrogen 1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology* 145(11): 4806-4812.
- De Sousa E, et al. (2001) Dual influence of disease and increased load on diaphragm muscle in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33(4): 699-710.
- De Sousa E, et al. (2000) Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation* 102(15): 1847-1853.
- Decary S, et al. (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 8(12): 1429-1438.
- Delp MD, et al. (1997) Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiology* 83: 1291-1299.
- Di Maso NA, Caiozzo VJ, Baldwin KM (2000) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(4): R1099-1106.
- Duance VC, et al. (1980) Polymyositis--an immunofluorescence study on the distribution of collagen types. *Muscle Nerve* 3(6): 487-490.
- Duance VC, et al. (1977) The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 79(2): 248-252.
- Dubowitz V, Pearse AG (1960) A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Z Zellforsch Microsk Anat Histochem* 2: 105-117.
- Duerr RL, et al. (1995) Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *Journal of Clinical Investigation* 95(2): 619-627.

- Ekmark M, et al. (2003) Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol* 548(Pt 1): 259-269.
- Eldridge CF, et al. (1986) Basal lamina-associated heparan sulphate proteoglycan in the rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies. *J Neurocytol* 15(1): 37-51.
- Elliot A, Offer G (1978) Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol* 123(4): 505-519.
- Feldman AM, et al. (1993) Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 73: 184-192.
- Filippatos GS, Anker SD, Kremastinos DT (2005) Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(3): 249-254.
- Filippatos GS, et al. (2003) Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: a comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol* 90(1):107-113.
- Foidart M, Foidart JM, Engel WK (1981) Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol* 38(3): 152-157.
- Frohlich ED (2000) Ischemia and fibrosis: the risk mechanisms of hypertensive heart disease. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research* 30(9): 1135-44.
- Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E (2005) Clinical aspects of heart failure; pulmonary edema, high-output failure. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E (Eds) *Braunwald's Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine* (7th ed). Elsevier Saunders, Philadelphia: 539-568.
- Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ (1994) Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120(4): 957-971.

- Gonçalves G, et al. (2005) O Bloqueio do sistema renina angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 84: 304-308.
- González A (2004) Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the rennin-angiotensin-aldosterone system. *Medical Clinics of North America* 88: 83-97.
- Guttridge DC, et al. (2000) NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 289(5488): 2363-2366.
- Hämäläinen N, Pette D (1993) The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem* 41(5): 733-743.
- Harrington D, et al. (1997) Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 30(7): 1758-1764.
- Hasty P, et al. (1993) Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364(6437): 501-506.
- Hauschka SD (1994) The embryonic origin of muscle. In: Engel AG, Franzini-Armstrong (Eds) *Myology* (2nd ed). McGraw-Hill, London: vol I, 3-73.
- Hilber K, et al. (1999) Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. *FEBS Lett* 455(3): 267-270.
- Hughes S.M., et al. (1999) Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J. Cell Biol.* 145(3): 633-642.
- Hughes SM, Blau HM (1992) Muscle fiber pattern is independent of cell lineage in postnatal rodent development. *Cell* 68(4): 659-671.
- Hughes SM, et al. (1997) MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev* 61(1-2): 151-163.
- Hughes SM, et al. (1993) Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118(4): 1137-1147.
- Hsu HH, et al. (1997) Expression of regulatory factors in normal and dystrophic mice: effects of IGF-1 treatment. *Biochem Mol Med* 60(2): 142-8.

- Huxley HE (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science* 164(886): 1356-65.
- Limoto DS, Covell JW, Harper E (1998) Increase in cross-linking of type I and type II collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circulation Research* 63: 399-408.
- Inoue S (1989) Ultrastructure of basement membranes. *Int Rev Cytol* 117: 57-98.
- Isgaard J, et al. (1997) Growth hormone improves cardiac function in rats with experimental myocardial infarction. *European Journal of Clinical Investigation* 27(6): 517-525.
- Isgaard J, et al. (1999) The role of the GH/IGF-1 axis for cardiac function and structure. *Hormone and Metabolism Research* 31(2-3): 50-4.
- Johnson RA, Wichern DW (1998) *Applied multivariate statistical analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall 642.
- Kandarian SC & Jackman RW (2006) Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33: 155-165.
- Kelly AM, Rubinstein NA (1994) The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology* (2nd ed). McGraw-Hill, London, 119-133.
- Kelly AM, Zacks SI (1969) The histogenesis of rat intercostal muscle. *J Cell Biol.* 42(1): 135-153.
- Kjaer M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84(2): 649-698.
- Larsson L, et al. (1991) MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol* 261(1 Pt 1): C93-101.
- Lassar AB, et al. (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66(2): 305-315.
- Lee SJ (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 61-86.

- Lehto M, et al. (1988). Macromolecular composition of the sarcolemma and endomysium in the rat. *Acta Anat (Basel)* 133(4): 297-302.
- Levine B, et al. (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323: 236-341.
- Light N, Champion AE (1984) Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J* 219(3): 1017-1026.
- Linsenmayer TF, et al. (1986) Avian type VI collagen. Monoclonal antibody production and immunohistochemical identification as a major connective tissue component of cornea and skeletal muscle. *Exp Cell Res* 165(2): 518-529.
- Lipkin DP, et al. (1988) Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 18(2): 187-195.
- Litwin SE, et al. (1995) Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 91: 2642-2654.
- Lopes FS, et al., (2008) Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int. Journal Exp. Pathology*, 2008. Aceito para publicação.
- Lowey S, et al. (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol* 42(1): 1-29.
- Ma PC, et al. (1994) Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77(3): 451-459.
- Maison P, Chanson P (2003) Cardiac effects of growth hormone in adults with growth hormone deficiency: a meta-analysis. *Circulation* 108(21): 2648-52.
- Mancini DM, et al. (1992) Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* 85(4): 1364-1373.
- Martinez, PF (2008) Expressão dos fatores de regulação miogênica, composição das miosinas e trofismo no músculo esquelético periférico de

- ratos com insuficiência cardíaca crônica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, FM de Botucatu, UNESP. 71p.
- Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.
- Mauro A, Adams WR (1961) The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. *J Biophys Biochem Cytol* 10(4) Suppl:177-185.
- McMurray J, et al. (1991) Increased concentrations of tumour necrosis factor in "cachectic" patients with severe chronic heart failure. *Br Heart J* 66(5): 356-358.
- McPherron AC, Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad. Sci USA* 94: 12457-12461.
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73(9-10): 723-732.
- Mitch WE, et al. (1999) Mechanisms causing muscle proteolysis in uremia: the influence of insulin and cytokines. *Miner Electrolyte Metab* 25(4-6): 216-9.
- Moreira VO (2006) A administração de GH atenua o desenvolvimento de fibrose miocárdica em ratos com insuficiência cardíaca secundária estenose aórtica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, FM de Botucatu, UNESP. 63p.
- Mozdziak PE, Greaser ML, Schultz E (1998) Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J Appl Physiol* 84(4): 1359-1364.
- Mozdziak PE, Greaser ML, Schultz E (1999) Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain isoform expression following hindlimb suspension. *Aviat Space Environ Med* 70(5): 511-516.
- Murre C, et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58(3): 537-544.
- Nabeshima Y, et al. (1993) Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364(6437): 532-535.

- Naya FJ, Olson E (1999) MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11(6): 683-8.
- Naya FJ, et al. (1999) Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development* 126(10): 2045-2052.
- Niebauer J, et al. (1998) Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol* 32: 393-7.
- Norman GR, Streiner DC (1994) *Biostatistics – The bare essentials*. Mos by year book. St. Lucas, p.260.
- Novitsch BG, et al. (1996) Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol* 135(2): 441-56.
- Novitsch BG, et al. (1999) pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr Biol* 9(9): 449-459.
- Ogata T (1958) A histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. *Acta Med. Okayama* 12: 233-240.
- Ontell M, Kozeka K (1984) The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *Am J Anat* 171(2): 133-148.
- Palmer CM, Rudnicki MA (2001) The myogenic regulatory factors. In: *Advances in Developmental Biology and Biochemistry*. Elsevier Science, New York: p. 1-32.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 4(7): 497-507.
- Patapoutian A, et al. (1995) Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development* 121(10): 3347-3358.
- Peter JB, et al. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11(14): 2627-2633.

- Pette D, Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170: 143-223.
- Pin CL, Merrifield PA (1997) Developmental potential of rat L6 myoblasts in vivo following injection into regenerating muscles. *Dev Biol* 188(1): 147-166.
- Poehlman ET (1999) Special considerations in design of trials with elderly subjects: unexplained weight loss, body composition and energy expenditure. *J Nutr* 129(1S Suppl): 260S-263S.
- Poole-Wilson PA, Ferrari R (1996) Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28(11): 2275-2285.
- Pourquie O (2001) Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 311-350.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 747-783.
- Ranvier L (1873) Properties et structures differentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *CR Hebd Seances Acad Sci* 7: 2062-2072.
- Rawls A, et al. (1995) Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 172(1): 37-50.
- Reindel JF, et al. (1990) Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. *Toxicol Appl Pharmacol* 106(2): 179-200.
- Remme WJ (2003) Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 17: 349-360.
- Ridgeway AG, Wilton S, Skerjanc IS (2000) Myocyte enhancer factor 2C and myogenin up-regulate each other's expression and induce the development of skeletal muscle in P19 cells. *J Biol Chem* 275(1): 41-46.
- Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ (1987) Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Development* 100(3): 383-394.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75(7): 1351-1359.

- Rutz R, Haney C, Hauschka S (1982) Spatial analysis of limb bud myogenesis: a proximodistal gradient of muscle colony-forming cells in chick embryo leg buds. *Dev Biol* 90(2): 399-411.
- Sanes JR (1982) Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol* 93(2): 442-451.
- Sanes JR (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278(15): 12601-12604.
- Schiaffino S, Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 77(2):493-501.
- Schiotz Thorud HM, (2005) Enhanced matrix metalloproteinase activity in skeletal muscles of rats with congestive heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(2): R389-R394.
- Schmalbruch H, Lewis DM (2000) Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23(4): 617-626.
- Schulze PC, Upate U (2005) Insulin-like growth factor 1 and muscle wasting in chronic heart failure. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2023-35.
- Schulze PC, et al. (2003) Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulin-like growth factor-1 in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 98: 267-274.
- Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther* 81(11): 1810-1816.
- Smith C.K. II, Janney M.J. & Allen R.E. (1994) Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Physiol.* 159(2): 379-385.
- Seed J, Hauschka SD (1984) Temporal separation of the migration of distinct myogenic precursor populations into the developing chick wing bud. *Dev Biol* 106(2): 389-393.
- Seward DJ, et al. (2001) bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(2): C408-413.

- Simonini A, et al. (1996) Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28(8):1683-1691.
- Siu PM, et al. (2004) Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training. *J Appl Physiol* 97(1): 277-85.
- Spangenburg EE, et al. (2002) Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol* 87(2): 182-186.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem Cell Biol* 111(2): 117-123.
- Staron RS (1997) Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* 22(4): 307-327.
- Staron RS, Pette D (1993) The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100(2): 149-153.
- Stassijns G, Lysens R, Decramer M (1996) Peripheral and respiratory muscles in chronic heart failure. *Eur Respir J* 9(10): 2161-217.
- Stephens HR, et al. (1982) Collagen types in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 53(1): 45-62.
- Stockdale FE (1992) Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154(2): 284-298.
- Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR (1990) Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 81(2): 518-527.
- Summerbell D, Rigby PW (2000) Transcriptional regulation during somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 48: 301-318.
- Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR (1993) Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol* 5(6): 695-705.
- Termin A, Staron RS, Pette D (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92(6): 453-457.

- Tisdale MJ, et al. (1997) Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. *British Journal of Cancer* 76(8): 1035-40.
- Tivesten A, et al. (2001) Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in rats after experimental myocardial infarction. *Growth Hormone & IGF Research* 11: 187-195.
- Toth MJ, et al. (1997) Skeletal muscle atrophy and peak oxygen consumption in heart failure. *Am J Cardiol* 79(9): 1267-1269.
- Toth MJ, Palmer BM, LeWinter MM (2006) Effect of heart failure on skeletal muscle myofibrillar protein content, isoform expression and calcium sensitivity. *Int J Cardiol* 107: 211-219.
- Vescovo G, et al. (1998) 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* 39(1): 233-241.
- Vescovo G, et al. (1996) 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* 76(4): 337-343.
- Vescovo G, et al. (2000) Apoptosis in the skeletal muscle of patients with heart failure: investigation of clinical and biochemical changes. *Heart* 84(4): 431-437.
- Voytik SL, et al. (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev Dyn* 198(3): 214-224.
- Walsh FS, Moore SE, Dhut S (1981) Monoclonal antibody to human fibronectin: production and characterization using human muscle cultures. *Dev Biol* 84(1):121-132.
- Warrick HM, Spudich JA (1987) Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* 3: 379-421.
- Weeds AG, Lowey S (1971) Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J Mol Biol* 61(3): 701-725.

- White NK, et al. (1975) Clonal analysis of vertebrate myogenesis. IV. Medium-dependent classification of colony-forming cells. *Dev Biol* 44(2): 346-361.
- Williams BA, Ordahl CP (1994) Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120(4):785-796.
- Wilson JR (1996) Evaluation of skeletal muscle fatigue in patients with heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28(11): 2287-2292.
- Wilson JR, Mancini DM, Dunkman WB (1993) Exertional fatigue due to skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation* 87(2): 470-475.
- Yoon JK, et al. (1997) Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus. *Dev Biol* 188(2): 349-62.
- Zacks SI, Sheff MF, Saito A (1973) Structure and staining characteristics of myofiber external lamina. *J Histochem Cytochem* 21(8): 703-714.
- Zornoff LAM, et al. (2000) Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 95: 208-214.