**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO
NA CARDIOMIOPATIA INDUZIDA POR HIPERATIVIDADE
SIMPÁTICA**

Aline Villa Nova Bacurau

**SÃO PAULO
2007**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA
CARDIOMIOPATIA INDUZIDA POR HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA**

ALINE VILLA NOVA BACURAU

**Dissertação apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Educação Física.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRICIA CHAKUR BRUM

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patricia Chakur Brum, por me aceitar como sua aluna e acreditar em meu trabalho, por colaborar para meu crescimento profissional, e pelo seu profissionalismo, sensibilidade e amizade, que me ensinou que a relação orientador/orientando pode ser feita da forma mais agradável;

À Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, por seus ensinamentos que vêm sendo fundamentais para minha vida científica, por sua colaboração que me fez conhecer um mundo totalmente diferente, e por sua paixão pela pesquisa científica, que sempre me contagia;

Ao Prof. Dr. Anselmo Moriscot, por sua colaboração que teve fundamental importância para o desenvolvimento desse projeto, e desde agora, pelas próximas colaborações que ainda estão por vir.

Ao Prof. Dr. Rui Curi, por viabilizar a realização de parte deste projeto em seu laboratório, por mostrar-se sempre atencioso e solícito quando necessário;

À Profa. Dra Cecília Gouveia e à Tatiana, pela colaboração para realização das avaliações em densitômetro;

À Profa. Dra Edilamar Menezes e ao Prof. Dr. Paulo Ramires, por serem como “tios científicos”, sempre nos orientando quando necessário, além de contribuírem, juntos com seus alunos, para o laboratório cujo ambiente é sempre agradável;

Às amigas e técnicas Katt e Marcele, do laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício, pelos ensinamentos e auxílio na realização dos experimentos;

Aos amigos do laboratório, Andréa, Ale, Rodrigo, Jan, Julio, Jaú, Natale, Carmão, Maíra, Marcelão, Telminha, Nara, Thiago, Fernanda, Fernando, Luís, Bruce e Leo, por todo auxílio e pelos momentos alegres que passamos juntos;

Aos “companheiros do grupo de músculo esquelético”, Carmão, Maíra e Telminha, por fazerem parte desse projeto e propagarem essa linha de pesquisa;

A todos do laboratório do Prof. Dr. Anselmo Moriscot, pela ajuda, profissionalismo e amizade;

Às grandes amigas Andréa e Elenice, por me acompanharem por esse caminho longo, sem nunca me abandonarem;

À minha mais nova grande amiga Natale, por estender seus conselhos “científicos” para minha vida pessoal, além de trazer mais alegrias a minha vida;

Às minhas queridas, Fátima e Thainá, por me ensinarem que na vida o que vale são as coisas simples;

Aos meus pais, Maria e Manoel, por TUDO que fizeram e fazem por mim. Agradeço por toda dedicação, incentivo e amor;

À minha não menos querida segunda família (Helena, Fransuar e Fabiana), pelo carinho que fui recebida, e por todo apoio e amor que recebi desde então;

Ao maior incentivador deste projeto, meu companheiro Frank, por sua compreensão, paciência, apoio e amor. Seu exemplo de profissionalismo e sua paixão pelo trabalho refletem no que sou hoje;

A todos amigos e familiares, que sempre me apoiaram e participaram da minha vida.

À FAPESP, pelo seu apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xviii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	xix
LISTA DE ANEXOS.....	xxiii
RESUMO.....	xxx
ABSTRACT.....	xxxii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Insuficiência Cardíaca.....	2
2.2 Modelo Genético de Cardiomiopatia por Hiperatividade Simpática.....	4
2.3 Alterações Musculares Esqueléticas Induzidas pela Estimulação Simpática.....	5
2.4 Alterações Musculares Esqueléticas Induzidas pela Insuficiência Cardíaca.....	10
2.4.1 Alterações no Metabolismo Muscular na Insuficiência Cardíaca.....	10
2.4.2 Alterações Estruturais da Musculatura Esquelética na Insuficiência Cardíaca.....	11
3 OBJETIVOS.....	15

3.1	Geral.....	15
3.2	Específicos.....	15
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1	Amostra.....	18
4.2	Identificação dos animais.....	18
4.3	Genotipagem.....	19
4.4	Avaliação Cardiovascular em Repouso.....	20
4.4.1	Registro indireto da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca....	20
4.4.2	Ecocardiograma.....	21
4.5	Avaliação da Capacidade Física.....	24
4.5.1	Teste de tolerância ao esforço.....	24
4.5.2	Determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo.....	24
4.6	Avaliação da Composição Corporal.....	27
4.6.1	Massa corporal.....	27
4.6.2	Razão peso úmido/seco do músculo esquelético.....	27
4.6.3	Medida indireta da composição corporal por DEXA.....	27
4.7	Avaliação da atividade locomotora espontânea de camundongos observados em campo aberto.....	29
4.8	Sacrifício e coleta dos tecidos.....	31
4.9	Avaliação da Caracterização Bioquímica do Músculo Esquelético.....	32
4.9.1	Processamento dos tecidos.....	32
4.9.2	Hexoquinase.....	32

4.9.3	Citrato sintase.....	33
4.9.4	Determinação da quantidade de proteína.....	34
4.10	Avaliação da Caracterização Histoquímica do Músculo Esquelético pela Reação Histoquímica para Miosina ATPase.....	35
4.10.1	Determinação da área de secção transversa e tipos de fibras musculares.....	37
4.10.2	Determinação da área de secção transversa do músculo plantar.....	38
4.10.3	Análise da razão capilar por fibra muscular.....	40
4.11	Determinação da concentração de noradrenalina circulante.....	41
4.12	Curva de sobrevida.....	41
4.13	Análise estatística.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Avaliação Cardiovascular em Repouso.....	43
5.1.1	Medidas hemodinâmicas.....	43
5.1.1.1	Pressão arterial caudal.....	43
5.1.1.2	Frequência cardíaca.....	44
5.1.1.3	Concentrações de noradrenalina circulante.....	45
5.1.2	Medidas ecocardiográficas.....	47
5.2	Curva de sobrevida.....	49
5.3	Avaliação da Capacidade Física.....	49
5.3.1	Tolerância à realização de esforço.....	49
5.3.2	Determinação da máxima fase estável do lactato sangüíneo.....	52
5.4	Avaliação da Composição Corporal.....	54

5.4.1	Massa corporal.....	54
5.4.2	Medida indireta da composição corporal por DEXA.....	55
5.4.3	Massa dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.....	55
5.4.4	Razão peso úmido e peso seco do músculo esquelético.....	55
5.5	Avaliação da atividade locomotora espontânea de camundongos observados em campo aberto.....	59
5.6	Avaliação da Caracterização Bioquímica do Músculo Esquelético.....	63
5.6.1	Atividade máxima da enzima hexoquinase.....	63
5.6.2	Atividade máxima da enzima citrato sintase.....	65
5.7	Determinação dos Tipos de Fibras Musculares e Medida da Área de Secção Transversa.....	67
5.7.1	Músculo sóleo.....	67
5.7.2	Músculo plantar.....	70
5.8	Avaliação da Capilarização Muscular.....	76
5.8.1	Músculo sóleo.....	77
5.8.2	Músculo plantar.....	77
5.8.3	Porção branca do músculo gastrocnêmio.....	77
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÃO.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1	
Amostra utilizada e distribuição entre os grupos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO).....	42
TABELA 2	
Massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal corrigida pela massa corporal, massa do tecido adiposo epididimal corrigida pela massa corporal, medida indireta da massa isenta de gordura e massa gorda em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	57
TABELA 3	
Peso úmido corrigido pela massa corporal, peso seco corrigido pela massa corporal e razão peso úmido / peso seco dos músculos sóleo e plantar e razão entre peso úmido e seco dos músculos sóleo e plantar em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Taxa de sobrevivência em camundongos controle (WT, n=30) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO, n=90) ao longo de 12 meses..... 14
FIGURA 2	Sistema para registro indireto de pressão arterial sistólica caudal e frequência cardíaca em camundongos..... 20
FIGURA 3	Avaliação Ecocardiográfica. (A) Animal anestesiado com halotano durante a avaliação. (B) Equipamento utilizado para Avaliação Ecocardiográfica (SEQUOIA 512). (C) Análise ecocardiográfica em modo monodimensional realizada em camundongos. 1- Espessura do epto interventricular na diástole; 2- Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; 3- Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 4- Espessura do septo interventricular na sístole; 5- Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; 6- Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole..... 23
FIGURA 4	(A) Esquema do teste da MFEL. (B) Coleta de sangue para análise do lactato. (C) Teste em esteira rolante para a determinação da máxima fase estável do lactato sangüíneo..... 26

FIGURA 5	Avaliação indireta da composição corporal. (A) Equipamento utilizado para avaliação da composição corporal (pDEXA® <i>Sabre Bone Densitomer</i>). (B). Medida do comprimento do quadril para o cálculo dos 2/3 acima da crista ilíaca. (C) Medida do corpo posterior.....	29
FIGURA 6	Foto do aparelho Campo Aberto (A). Foto do camundongo durante a realização da variável comportamental levantar (B).....	31
FIGURA 7	Extração do tecido. Retirada a loja posterior (A), foi realizado um corte transversal com uma lâmina nova sobre uma base de cera dental (B). Este corte foi importante para a penetração do isopentano no tecido durante o momento do congelamento. Em seguida, foi colocada uma massa de fígado sobre uma placa que identificou a amostra (C). A loja posterior foi colocada sobre a massa de fígado (D) que serviu como apoio para o tecido permanecer na posição correta durante o congelamento.....	35

- FIGURA 8 Congelamento e cortes de tecidos. Para o congelamento, foi usado isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Quando o isopentano ficou com a base congelada, o tecido foi emerso (A). O fragmento foi introduzido no isopentano durante 10 segundos (B e C) e posteriormente colocado em outro tubo falcon de 50 de ml contendo nitrogênio líquido. Os tecidos foram conservados em nitrogênio líquido onde a temperatura é de aproximadamente -196 °C (D). Para os cortes, mantidos à temperatura média de 25 °C, foi utilizado Criostato Mícron® HM505E, onde foram feitos cortes seriados na espessura de 10 µm (E)..... 36
- FIGURA 9 Disposição dos músculos sóleo (S), plantar (P), porção vermelha do gastrocnêmio (PV) e porção branca do gastrocnêmio (PB), nos diferentes pHs: 10,3 (A) e 4,3 (B). Figura adaptada de (SPURWAY, 1981), indicação dos músculos S, P, gastrocnêmio medial (GM) e gastrocnêmio lateral (GL) (C). Disposição dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar, da superfície muscular até a região mais profunda (D)..... 39
- FIGURA 10 Classificação dos diferentes subtipos de fibras musculares. (A) Escala de coloração atribuída para cada tipo de fibra no pH 4,3 e 10,3 (C). Exemplo da classificação dos tipos de fibras do músculo sóleo nos diferentes pHs: 4,3 (B) e 10,3 (C)..... 40
- FIGURA 11 Capilarização em diferentes músculos: sóleo (A), plantar (B) e porção branca do gastrocnêmio (C)..... 41

FIGURA 12	Comportamento da pressão arterial dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	44
FIGURA 13	Comportamento da frequência cardíaca em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	45
FIGURA 14	Concentrações de noradrenalina plasmática de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	46
FIGURA 15	Fração de encurtamento (A), fração de ejeção (B) e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (C) dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	48
FIGURA 16	Curva de sobrevivência dos animais controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO).....	49

FIGURA 17	Distância total percorrida (A) e velocidade máxima atingida (B) dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	51
FIGURA 18	Determinação da máxima fase estável do lactato sangüíneo por meio de três cargas submáximas. (A) Camundongos controle (WT) e (B) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos cinco meses de idade.....	53
FIGURA 19	Velocidade atingida na máxima fase estável do lactato sangüíneo pelos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.....	54
FIGURA 20	Análise comportamental da atividade locomotora espontânea em teste de campo aberto. (A) Avaliação da variável comportamental locomoção e (B) Avaliação da variável comportamental levantar em camundongos controle (WT) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	61

FIGURA 21	Análise comportamental da atividade locomotora espontânea em teste de campo aberto. (A) Avaliação da variável comportamental locomoção e (B) Avaliação da variável comportamental levantar nos 150 segundos finais em camundongos controle (WT) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade. (C) Latência dos grupos WT e KO aos três e sete meses de idade. (D) Ilustração da medida da latência.....	62
FIGURA 22	Avaliação da atividade máxima da enzima hexoquinase em camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Músculo sóleo. (B) Porção vermelha do músculo gastrocnêmio. (C) Porção branca do músculo gastrocnêmio.....	64
FIGURA 23	Avaliação da atividade máxima da enzima citrato sintase em camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Músculo sóleo. (B) Porção vermelha do músculo gastrocnêmio. (C) Porção branca do músculo gastrocnêmio.....	66
FIGURA 24	Determinação do tipo de fibra no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e KO aos três, cinco e sete meses de idade. (A) % de fibras do tipo I, (B) % de fibras Intermediárias e (C) % de fibras do tipo IIA...	68

FIGURA 25	Área de secção transversa por tipo de fibra no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e KO aos três, cinco e sete meses de idade. (A) Fibras do tipo I, (B) Fibras Intermediárias e (C) Fibras do tipo IIA.....	69
FIGURA 26	Determinação do tipo de fibra no músculo plantar de camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) % de fibras do tipo IIA, (B) % de fibras Intermediárias e (C) % de fibras do tipo IIB.....	72
FIGURA 27	Imagens do diâmetro de fibras do músculo plantar obtidos pela reação histoquímica para miosina ATPase em pH 10,3 de camundongos controle (WT) e KO. Os asteriscos vermelhos indicam as fibras do tipo IIA e os asteriscos amarelos, as fibras do tipo IIB. (A) Animal WT aos três meses de idade. (B) Animal KO aos três meses de idade. (C) Animal KO aos sete meses de idade.....	73
FIGURA 28	Área de secção transversa por tipo de fibra no músculo plantar de camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Fibras do tipo IIA, (B) Fibras Intermediárias e (C) Fibras do tipo IIB.....	74

FIGURA 29	Área de secção transversa do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade (A). Imagem do músculo plantar de um animal WT aos três meses de idade representada pela linha pontilhada vermelha (B) e do músculo plantar de um animal KO aos três meses de idade (C).....	75
FIGURA 30	Área de secção transversa do músculo plantar normalizada pela massa corporal de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	76
FIGURA 31	Avaliação da capilarização do músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. (A) Razão capilar por fibra do tipo I. (B) Razão capilar por fibra do tipo IIA.....	78
FIGURA 32	Avaliação da capilarização do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. (A) Razão capilar por fibra do tipo IIA. (B) Razão capilar por fibra do tipo IIB. (C) Razão capilar por fibra.....	79

FIGURA 33	Avaliação da razão capilar por fibra da porção branca do músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.....	80
FIGURA 34	Esquema do resumo de resultados apresentados neste projeto.....	106

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1	
Densidade do receptor β -adrenérgico (B_{max}) em diferentes músculos esqueléticos (com variação na % de distribuição de fibras musculares) e no tecido cardíaco (JENSEN, BRENNESVIK, BERGERSEN, OSELAND, JEBENS & BRORS, 2002) de ratos Wistar.....	9
QUADRO 2	
Resumo da metodologia executada para o desenvolvimento deste projeto.....	17

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Akt	Proteína serina/treonina quinase-
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon Ca ²⁺
CoA	Coenzima A
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CP	Creatina fosfato
DATASUS	Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DC	Débito cardíaco
DDiaVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DEXA	<i>Dual-energy X-ray absorptiometry</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DSisVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FOXO	Fatores de transcrição <i>forkhead Box O</i>
FS	Fração de encurtamento
G6PDH	Enzima glicose-6 fosfato desidrogenase
hGH	Hormônio do crescimento
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IC	Insuficiência cardíaca
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
KO	Nocaute para os receptores alfa 2A e alfa 2C-adrenérgico
MFEL	Máxima fase estável do lactato sangüíneo
MGF	<i>Mechano Growth Factor</i>
MHC	Miosina de cadeia pesada
Modo M	Modo monodimensional
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>

Na ⁺	Sódio
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAPDH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NCX	Trocador Na ⁺ / Ca ²⁺
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pi	Fosfato inorgânico
PPDia	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPSis	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
SERCA	Proteína sarco-endo retículo Ca ²⁺ -ATPase
SIVDia	Espessura do septo interventricular na diástole
SIVSis	Espessura do septo interventricular na sístole
TNF _α	Fator de necrose tumoral
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
WT	<i>Wild type</i>
α	Alfa
β	Beta

Unidades

mm Hg	Milímetros de mercúrio
bpm	Batimento por minuto
L	Litro
mL	Microlitro (10^{-6})
m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
μm	Micrometro (10^{-6})
min	Minuto
ms	Milisegundo
g	Grama
mg	Miligrama
μg	Micrograma (10^{-6})
pg	Picograma (10^{-12})
mM	Milimolar (10^{-3})
μM	Micromolar (10^{-6})

LISTA DE ANEXOS

		Página
ANEXO I	Pressão arterial, em mm Hg, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	132
ANEXO II	Frequência cardíaca, em batimentos por minuto, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	134
ANEXO III	Concentrações de noradrenalina plasmáticas, em pg/ml, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	136
ANEXO IV	Fração de encurtamento de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	137
ANEXO V	Fração de ejeção de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	138

ANEXO VI	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, em cm, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	139
ANEXO VII	Distância total percorrida, em metros, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	140
ANEXO VIII	Velocidade máxima atingida, em m/min, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	141
ANEXO VIX	Velocidade atingida na máxima fase estável do lactato sangüíneo, em m/min, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	142
ANEXO X	Massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	143
ANEXO XI	Tecido adiposo retroperitoneal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	145

ANEXO XII	Tecido adiposo epididimal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	146
ANEXO XIII	Massa isenta de gordura e massa gorda corrigida pela massa corporal de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade.	147
ANEXO XIV	Razão peso úmido / peso seco do músculo plantar, em miligramas, corrigida pela massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	148
ANEXO XV	Razão peso úmido / peso seco do músculo sóleo, em miligramas, corrigida pela massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	150
ANEXO XVI	Frequência de locomoção e frequência de levantar em teste de campo aberto com duração de cinco minutos em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	152
ANEXO XVII	Frequência de locomoção e frequência de levantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade avaliados em teste de campo aberto nos	153

dois minutos e trinta segundos finais.

ANEXO XVIII	Latência de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade avaliados em teste de campo aberto.	154
ANEXO XIX	Atividade máxima da enzima hexoquinase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos controle (WT) aos três e sete meses de idade.	155
ANEXO XX	Atividade máxima da enzima hexoquinase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	156
ANEXO XXI	Atividade máxima da enzima citrato sintase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos controle (WT) aos três e sete meses de idade.	157

ANEXO XXII	Atividade máxima da enzima citrato sintase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	158
ANEXO XXIII	Percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	159
ANEXO XXIV	Percentual de fibras do tipo IIA no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	160
ANEXO XXV	Percentual de fibras do tipo IIA no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	161
ANEXO XXVI	Percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	162
ANEXO XXVII	Área de secção transversa das fibras do tipo I, em μm^2 , no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	163

ANEXO XXVIII	Área de secção transversa das fibras do tipo IIA, em μm^2 , no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	164
ANEXO XXIX	Área de secção transversa das fibras do tipo IIA, em μm^2 , no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	165
ANEXO XXX	Área de secção transversa das fibras do tipo IIB, em μm^2 , no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	166
ANEXO XXXI	Área de secção transversa do músculo plantar, em μm^2 , de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	167
ANEXO XXXII	Razão capilar por fibra do músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.	168

ANEXO XXXIII	Razão capilar por fibra do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	169
ANEXO XXXIV	Razão capilar por fibra na porção branco do músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.	170

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA CARDIOMIOPATIA INDUZIDA POR HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA

Autora: ALINE VILLA NOVA BACURAU

Orientadora: Profa. Dra. PATRICIA CHAKUR BRUM

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta incidência e mau prognóstico, caracterizada por fadiga, dispnéia e grande limitação aos esforços físicos. Essas alterações não estão apenas limitadas ao comprometimento cardíaco, mas em parte, são decorrentes também de alterações morfo-funcionais da musculatura esquelética. Para a dissertação foram utilizados camundongos com deleção dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos (KO) que desenvolvem cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, associada à sinais clínicos de IC e 50% de mortalidade aos sete meses de idade. Foi objetivo desse estudo realizar a caracterização fenotípica do músculo esquelético por meio de avaliações funcionais e morfológicas em camundongos KO previamente ao desenvolvimento da IC (três meses de idade), e ao longo de sua progressão (cinco e sete meses de idade). Somente na faixa etária de sete meses de idades foi constatado o estabelecimento da miopatia muscular esquelética. Nessa fase, observou-se rarefação vascular, atrofia muscular, aumento na porcentagem de fibras glicolíticas e redução na atividade máxima da enzima citrato sintase, que em conjunto, contribuem para a antecipação da fadiga observada nesse modelo, e como consequência, para a redução da tolerância aos esforços. Os resultados sugerem que os camundongos KO

apresentam alterações morfo-funcionais da musculatura esquelética semelhantes às observadas nos demais modelos de IC e em indivíduos portadores dessa síndrome. Portanto, sendo um ótimo modelo experimental para estudos de futuras estratégias terapêuticas que visem minimizar as alterações na musculatura esquelética decorrentes da IC.

Palavras-chave: insuficiência cardíaca, sistema nervoso simpático, músculo esquelético, camundongos geneticamente modificados.

.

ABSTRACT

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF SKELETAL MUSCLE IN CARDIOMYOPATHIE INDUCED BY SIMPATHETIC HYPERACTIVITY

Author: ALINE VILLA NOVA BACURAU

Adviser: Profa. Dra. PATRICIA CHAKUR BRUM

Heart failure (HF) is a clinical syndrome with high incidence and bad prognostic, characterized by fatigue, dyspnea, and increased intolerance to exercise. These changes are not only related to the cardiovascular tissue, but are at least in part, consequence of morphofunctional alterations in skeletal muscles. To the present study it was used mice lacking both α_{2A}/α_{2C} AR subtypes (KO) which develop cardiomyopathy induced by sympathetic hyperactivity, associated to clinical signals of HF and 50% of mortality at seven months of age. The aim of the present study was characterize the phenotype of skeletal muscle by functional and morphological evaluations in KO before (three months of age) and during the HF progression (five and seven months of age). Skeletal muscle alterations due HF were observed only at seven months of age. The alterations were characterized by vascular rarefaction, muscular atrophy, increase in glycolitic fibers percentage and reduction of maximal activity of citrate synthase and contributed with early fatigue observed in this model, and consequently, exercise intolerance. The results of present study suggest that KO mice present morphofunctional changes in skeletal muscles in a similarly to others models of HF and in patients that have this syndrome. Therefore, consisting in an

excellent experimental model to future studies related to therapeutic strategies to minimize the skeletal muscle changes due HF.

Key-terms: heart failure, sympathetic nervous system, skeletal muscle, knockout mice.

.

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta prevalência e mau prognóstico, caracterizada por fadiga, dispnéia, grande limitação aos esforços físicos além de diminuição da expectativa de vida (COLUCCI, 1998; LUNDE, SJAASTAD, SCHIOTZ THORUD & SEJERSTED, 2001b). Portadores de IC quando submetidos a testes de esforço progressivo apresentam índices de disfunção cardíaca e diminuição na fração de ejeção durante o exercício mesmo antes dos sinais e sintomas clínicos de IC estarem presentes (BROWN, 1994), caracterizando-se como um excelente teste prognóstico para IC. Além da utilidade como critério para prognóstico, os testes de tolerância ao esforço também permitem constatar uma significativa diminuição da potência aeróbia (menor consumo de oxigênio de pico atingido durante a avaliação).

Essas alterações relativas à tolerância ao esforço físico podem estar associadas ao já demonstrado comprometimento central (ex. diminuição do débito cardíaco e fração de ejeção), entretanto, muitos estudos demonstram que alterações morfofuncionais da musculatura esquelética estão mais correlacionadas ao desenvolvimento da intolerância nesta síndrome (HARRINGTON, ANKER, CHUA, WEBB-PEPLOE, PONIKOWSKI, POOLE-WILSON & COATS, 1997; VENTURA-CLAPIER, GARNIER & VEKSLER, 2004). Dessa forma, vem sendo ampliado o número de trabalhos sobre o envolvimento da musculatura esquelética na intolerância ao esforço observada na IC. A hipótese que orienta essa nova abordagem propõe que pelo menos em parte, o comprometimento pode ser atribuído a mudanças periféricas e ficou conhecida como hipótese muscular (LUNDE, SJAASTAD, SCHIOTZ THORUD & SEJERSTED, 2001a).

A alteração progressiva do tecido muscular esquelético na IC reflete no agravamento do quadro clínico de portadores da síndrome, piorando o prognóstico do paciente, não apenas pela piora na qualidade de vida, mas também pela perda de autonomia. Um fator determinante nessas alterações funcionais é a atrofia muscular, que é caracterizada por diminuição no conteúdo protéico, redução no diâmetro das

fibras musculares, redução da força muscular e menor resistência à fadiga (JACKMAN & KANDARIAN, 2004) podendo ulteriormente culminar em caquexia (do grego: *Kakos*, má, ruim e *hexis*, condição do corpo). A caquexia é uma condição resultante de várias doenças sistêmicas como o câncer, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o diabetes *mellitus*, a sepsis, a insuficiência renal, e a insuficiência cardíaca, para esta última normalmente é atribuída a denominação *caquexia cardíaca* (MORLEY, THOMAS & WILSON, 2006; SCHULZE, GIELEN, SCHULER & HAMBRECHT, 2002). Pacientes portadores de IC que manifestam o quadro de caquexia, normalmente apresentam perda excessiva de peso corporal associada à perda de massa óssea, gorda e magra, além de ser considerado marcador independente de mortalidade em portadores de IC grave (ANKER, SWAN, VOLTERRANI, CHUA, CLARK, POOLE-WILSON & COATS, 1997). Dessa forma, sendo de grande relevância clínica, a realização de estudos relacionados às alterações musculares esqueléticas decorrentes da IC.

A seguir, discutiremos em maior detalhe sobre a IC e seus efeitos no tecido muscular esquelético, além da contribuição dessas alterações músculo-esqueléticas no agravamento da síndrome.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência Cardíaca

A IC representa importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e os altos índices de hospitalização associados. Atualmente, estima-se que cerca de 4,6 milhões de pacientes nos Estados Unidos tenham IC, sendo 550 mil novos casos a cada ano¹. No Brasil, segundo DATASUS², do Ministério da Saúde, existem cerca de dois milhões de pacientes com IC e incidência de 240 mil novos casos ao ano. A mortalidade anual oscila em torno de 10% para

¹ Fonte: *American Heart Association*. Dados disponíveis no site www.americanheart.org

² Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtm.htm>

pacientes nas diferentes classes de IC e de 30 a 40% para enfermos em classe funcional IV da *New York Heart Association* (BROWN, 1994).

A IC é uma síndrome clínica e a via final de grande parte das doenças cardíacas e do aparelho circulatório, sendo caracterizada por falência do coração em propiciar suprimento adequado de sangue às necessidades metabólicas teciduais (MARKS, 2003). Em última instância, a redução do débito cardíaco desencadeia a ativação reflexa do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina. Essa resposta inicialmente é benéfica, pois está associada à taquicardia, aumento da contratilidade e ulterior aumento no débito cardíaco. No entanto, a hiperativação do sistema nervoso simpático, em longo prazo está associada a diversos efeitos deletérios, dentre eles, destaca-se seu efeito tóxico direto pela auto-oxidação das catecolaminas (MOLAVI & MEHTA, 2004), disfunção contrátil (DHALLA, AFZAL, BEAMISH, NAIMARK, TAKEDA & NAGANO, 1993) e arritmias (NERHEIM, BIRGER-BOTKIN, PIRACHA & OLSHANSKY, 2004). Embora esse efeito tóxico seja bem descrito no tecido cardíaco, ainda não é bem conhecida sua implicação na musculatura esquelética, cuja ativação simpática ocorre via receptor β_2 -adrenérgico (vide item 2.3).

Não obstante a ação tóxica das catecolaminas sobre o miocárdio, vários estudos têm demonstrado que a limitação da capacidade funcional perante o agravamento da IC não está somente relacionada ao grau de disfunção ventricular (FRANCIOSA, PARK & LEVINE, 1981). A redução da capacidade funcional dos pacientes com IC também é decorrente de importantes alterações nos tecidos periféricos (LEJEMTEL, 1986; WILSON, MARTIN, SCHWARTZ & FERRARO, 1984; ZELIS & FLAIM, 1982). De modo que o completo entendimento das alterações decorrentes da IC só pode ser obtido quando se levam em consideração tais modificações. Entretanto, mesmo tendo conhecimento da contribuição das alterações musculares esqueléticas para a progressão da IC, pouco desse conhecimento é transferido para o tratamento da IC.

Atualmente a terapia da síndrome visa bloquear os efeitos tóxicos da hiperestimulação do sistema nervoso simpático (antagonistas β -adrenérgicos) e do sistema renina-angiotensina (inibidores da enzima de conversão da angiotensina e

bloqueadores dos receptores AT_1) sobre o tecido cardíaco (KATZ, 1986; PACKER, 1992), porém, pouco é conhecido sobre os efeitos dessas drogas no músculo esquelético, além disso, uma das limitações metodológicas desses estudos, é a dificuldade em separar o efeito do tratamento no tecido cardíaco com seu subsequente efeito na periferia, ou seja, do efeito direto do tratamento na musculatura esquelética.

De fato, o conhecimento do efeito da exacerbação simpática no tecido cardíaco, bem como os mecanismos moleculares desencadeados por essa ativação superam o conhecimento relatado na musculatura esquelética até o presente momento. Dessa forma, o modelo genético de hiperestimulação do sistema nervoso simpático mostra-se uma importante ferramenta para o entendimento do efeito da hiperatividade simpática sobre o tecido muscular esquelético, além de contribuir para futuros estudos envolvendo diferentes formas de tratamento, visando o benefício da periferia na IC.

2.2 Modelo Genético de Cardiomiopatia por Hiperatividade Simpática

Com o advento de técnicas de DNA recombinante, modelos animais geneticamente modificados foram produzidos com o intuito de mimetizar diversas condições patológicas e contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na origem e progressão das patologias.

Recentemente, foi descrito na literatura um modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática (BRUM, KOSEK, PATTERSON, BERNSTEIN & KOBILKA, 2002). Esse modelo consiste na deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos em camundongos. Estes animais apresentam concentrações elevadas de noradrenalina plasmática (HEIN, ALTMAN & KOBILKA, 1999), o que sugere hiperatividade do sistema nervoso simpático. Além disso, esses animais apresentam 50% de mortalidade aos sete meses de idade acompanhado por edema pulmonar (FERREIRA, EVANGELISTA, BACURAU, TEIXEIRA, ROSA, IRIGOYEN, CASARINI, OLIVEIRA, KRIEGER & BRUM, 2006). As conseqüências deletérias desta hiperatividade simpática resultam em diminuição na contratilidade cardíaca,

perda de cardiomiócitos e intolerância ao exercício físico com diminuição significativa na capacidade máxima de realização de esforço (BRUM et al., 2002).

Os receptores α_2 -adrenérgicos regulam a atividade simpática por meio de diferentes mecanismos. No bulbo rostro-ventro-lateral, os receptores α_{2A} -adrenérgicos são pós-sinápticos e regulam o tônus simpático. Quando ativados, eles desencadeiam bradicardia e hipotensão (ALTMAN, TRENDLENBURG, MACMILLAN, BERNSTEIN, LIMBIRD, STARKE, KOBILKA & HEIN, 1999). Em neurônios simpáticos periféricos ambos os receptores α_{2A} - e α_{2C} -adrenérgicos estão localizados no terminal pré-sináptico e regulam a liberação do neurotransmissor, no caso a noradrenalina (HEIN, LIMBIRD, EGLEN & KOBILKA, 1999). Quando ativados, por ação da noradrenalina, eles inibem a liberação da mesma pelo terminal nervoso simpático e por isso são comumente denominados “autorreceptores”. Portanto, os camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos (KO) constituem-se no primeiro modelo experimental a ser descrito na literatura que desenvolve cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Além disso, esses animais constituem um modelo adequado para o estudo do mecanismo pelo qual o aumento da atividade simpática, *per se*, leva a uma deterioração da função cardíaca, e também pode contribuir para um melhor entendimento sobre o efeito dessa hiperestimulação na musculatura esquelética.

2.3 Alterações Musculares Esqueléticas Induzidas pela Estimulação Simpática

A atividade nervosa simpática no músculo esquelético é mediada pela ativação de receptores adrenérgicos tanto pela ação de catecolaminas circulantes, quanto pela inervação de terminais nervosos simpáticos (NAVEGANTES, RESANO, BAVIERA, MIGLIORINI & KETTELHUT, 2004). Dentre os receptores adrenérgicos apenas o subtipo β é expresso no músculo esquelético, sendo a via de sinalização β -adrenérgica envolvida na regulação de vários processos fisiológicos como, o metabolismo de glicogênio, o consumo de glicose, o metabolismo de lipídeos e transporte eletrolítico (PETERS, DYCK, BONEN & SPRIET, 1998; WILLIAMS &

BARNES, 1989), embora, a função fisiológica da atividade simpática no tecido muscular esquelético ainda não seja por completo entendida.

É descrito na literatura, que cerca de 80-95% dos receptores β -adrenérgicos expressos no músculo esquelético são do subtipo β_2 (ELFELLAH, DALLING, KANTOLA & REID, 1989). No músculo sóleo (músculo postural composto principalmente por fibras tipo I) ainda observa-se uma população muito pequena de receptores do subtipo β_1 , já no músculo plantar (músculo de contração rápida com alta porcentagem de fibras do tipo II) é expresso somente o subtipo β_2 (KIM, SAINZ, SUMMERS & MOLENAAR, 1992). Além da alteração na razão entre os receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos expressos em diferentes músculos esqueléticos, existem também diferenças quanto a densidade de receptores β -adrenérgicos nos diferentes tipos de fibras, onde, as fibras do tipo I apresentam de duas a três vezes maior densidade de receptores β -adrenérgicos do que as fibras do tipo II (JENSEN, BRORS & DAHL, 1995; KIM, SAINZ, MOLENAAR & SUMMERS, 1991; MARTIN, MURPHREE & SAFFITZ, 1989). Recentemente um grupo de pesquisadores realizaram a determinação quantitativa de receptores β -adrenérgicos na superfície celular de diferentes músculos esqueléticos de ratos, e observaram que o músculo sóleo apresentava uma densidade de receptores β -adrenérgicos muito próxima da alta densidade encontrada no coração (ventrículo esquerdo), o oposto foi observado nos músculos de contração rápida (QUADRO 1) (JENSEN et al., 2002). De fato, essas diferenças se mostram importantes quando é relacionado à reação de “luta ou fuga” com os diferentes tipos de fibras, pois as fibras do tipo II são recrutadas em altas intensidades onde a concentração das catecolaminas é elevada e a resistência ao agonista é grande, devido principalmente à baixa densidade de receptores presente nestas fibras. Já as fibras do tipo I apresentam um limiar de excitabilidade baixo, portanto, são recrutadas em intensidades menores com baixa concentração de catecolaminas, isso pode explicar em parte a alta densidade de receptores presente neste tipo de fibra.

Dentre os efeitos da estimulação β -adrenérgica no músculo esquelético, é observado hipertrofia muscular e mudança no tipo de fibra (I $\rightarrow$ II) (YANG & MCELLIGOTT, 1989). Entretanto, os mecanismos relacionados ao aumento no

crescimento radial do músculo esquelético induzido por estimulação adrenérgica ainda não são totalmente esclarecidos. Segundo um grupo de pesquisadores, a hipertrofia muscular não poderia ocorrer de forma indireta, pois diversos fatores (insulina, IGF-I, T_3 , cortisol, testosterona, etc.) que poderiam contribuir com esse fenótipo, nem sempre são alterados mediante a estimulação β -adrenérgica, ou quando alterados seus efeitos perduram por pouco tempo (YANG & MCELLIGOTT, 1989). No entanto, a estimulação β -adrenérgica de tecidos não musculares esqueléticos como o tecido conjuntivo e o músculo liso poderia levar a secreção de fatores ou hormônios, que por ação parácrina, levariam ao aumento da massa muscular esquelética. Quanto ao mecanismo de ação direta da estimulação simpática sobre o músculo esquelético, acredita-se ser mediado pela alteração do *turnover* protéico, ou seja, um desequilíbrio entre síntese e degradação protéica que favoreceria o ganho de massa muscular. De fato, recentemente foi demonstrado que o tratamento com clenbuterol (agonista β_2 -adrenérgico) reduziu a atrofia por desuso por meio da diminuição dos componentes do sistema ubiquitina-proteossoma (YIMLAMAI, DODD, BORST & PARK, 2005). Nesse estudo não foi observada alteração do peptídeo IGF-I, demonstrando que a ação da ativação via receptores β -adrenérgicos tem como principal efeito a inibição da degradação protéica e não a ativação da síntese protéica. Outros estudos atribuem esse efeito anabólico devido à inibição no sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} (HIGGINS, LASSLETT, BARDSLEY & BUTTERY, 1988; NAVEGANTES, RESANO, MIGLIORINI & KETTELHUT, 2001), o que se conclui, que os mecanismos moleculares envolvidos no ganho de massa muscular ainda não estão bem esclarecidos. Portanto a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos em curto prazo favorece a prevenção da perda de massa muscular, que parece ocorrer por atenuação da degradação muscular. No entanto, os efeitos da estimulação dos receptores β_2 -adrenérgico a longo prazo são menos conhecidos.

O efeito promotor de crescimento atribuído aos agonistas β_2 -adrenérgicos, por sua vez é limitado pelo tempo de administração da droga, apresentando atenuação do efeito hipertrófico em tratamentos prolongados (KIM, LEE & ASHMORE, 1988; KIM, LEE, GARRETT & DALRYMPLE, 1989; MCELLIGOTT,

BARRETO & CHAUNG, 1989). Essa desaceleração da taxa de crescimento ocorre pela redução da densidade de receptores β -adrenérgicos, causada pela exposição crônica dos receptores ao agonista. Um estudo demonstrou que o tratamento com clenbuterol por 18 dias reduziu 50% da densidade de receptores β_2 -adrenérgicos no músculo esquelético (ROTHWELL, STOCK & SUDERA, 1987). De fato, o primeiro estudo de internalização de receptor β_2 -adrenérgico demonstrou que após 30 minutos de estimulação por agonista β_2 -adrenérgico, cerca de 50% dos receptores do músculo sóleo foram internalizados, e somente 30% retornaram a superfície celular (JENSEN et al., 2002).

Outro fator importante que pode influenciar na resposta à estimulação crônica dos receptores β_2 -adrenérgicos na musculatura está associado a constituição do músculo em relação ao tipo de fibra que o compõe. Alguns estudos apresentam menor ou nenhuma resposta hipertrófica no músculo sóleo quando comparado aos músculos compostos principalmente por fibras de contração rápida, mesmo sendo esses os que possuem menor densidade de receptores β_2 -adrenérgicos. Essa diferença na resposta anabólica ao estímulo β_2 -adrenérgico nos diferentes músculos esqueléticos pode ter relação com a taxa de internalização dos receptores. No músculo sóleo, quando estimulado por altas concentrações de agonista β_2 -adrenérgico, cerca de 42% dos receptores são internalizados, diferente do músculo epitroclear que internaliza apenas 29% dos receptores, sugerindo que a diminuição da densidade de receptores β_2 -adrenérgicos ocorre mais rapidamente em fibras de contração lenta, do que em fibras de contração rápida (JENSEN et al., 2002; KIM et al., 1991). Outro fator importante sobre os diferentes tipos de fibras está relacionado com a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), o qual atua como segundo mensageiro após a estimulação β_2 -adrenérgica, e apresenta diferentes efeitos qualitativos entre músculos de contração rápida e músculos de contração lenta (RODGER & BOWMAN, 1983).

Portanto, no presente projeto será de grande interesse observar os efeitos da estimulação crônica dos receptores β_2 -adrenérgicos sobre o trofismo de músculos com diferentes constituições de fibras musculares esqueléticas. No entanto, visto que a IC é uma síndrome multifatorial que envolve alterações em diferentes sistemas, e

que a ativação simpática ocorre concomitantemente ao desencadeamento da miopatia esquelética, a dificuldade em separar o efeito da IC do efeito da ativação simpática no músculo esquelético pode ser um fator limitante. Entretanto, uma das faixas etárias estudadas neste projeto (três meses de idade), fase em que a cardiomiopatia é inicial, permitirá uma visão mais discriminada quanto aos efeitos da ativação simpática no músculo esquelético, antes da ação da IC no mesmo, pois nessa faixa etária a IC ainda não está estabelecida.

QUADRO 1 - Densidade do receptor β -adrenérgico (B_{max}) em diferentes músculos esqueléticos (com variação na % de distribuição de fibras musculares) e no tecido cardíaco (JENSEN et al., 2002) de ratos Wistar.

	B_{max} (fmol/mg peso seco)	% do tipo de fibra		
		Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Sóleo	32,8±0,9	87	13	0
Gastrocnêmio (porção vermelha)	18,7±0,7	30	62	8
Epitroclear	16,8±1,0	10-15	15-23	67-70
Plantar	16,2±1,0	9	50	41
Flexor digitório curto	16,2±0,8	7	92	1
Extensor digitório longo	13,7±0,7	2	42	56
Gastrocnêmio (porção branca)	10,4±0,5	0	16	84
Vasto lateral (porção branca)	12,1±0,6	0	3	97
Coração	36,4±0,8	—	—	—

2.4 Alterações Musculares Esqueléticas Induzidas pela Insuficiência Cardíaca

2.4.1 Alterações no Metabolismo Muscular na Insuficiência Cardíaca

Alterações no metabolismo energético durante a realização de esforços físicos podem ser os fatores causais da menor capacidade funcional dos portadores de IC. Num teste de esforço progressivo até a exaustão, por exemplo, espera-se um determinado padrão de sobreposição do metabolismo anaeróbio sobre o aeróbio à medida que se aumenta a sobrecarga (JANSSEN, 2001). Em portadores de IC, o acionamento do metabolismo anaeróbio partindo do repouso ocorre precocemente, pois se observa maior acúmulo de lactato para uma determinada intensidade de esforço (VESCOVO, 2002). Ao contrário do que foi suposto inicialmente (SCHULZE et al., 2002; VESCOVO, AMBROSIO & DALLA LIBERA, 2001), essa alteração no metabolismo energético não está diretamente relacionada ao comprometimento da perfusão da musculatura ativa (FINK, WILSON & FERRARO, 1986; SULLIVAN, GREEN & COBB, 1990; WILSON et al., 1984). Recentemente um estudo demonstrou que a administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina por 10 semanas em animais com IC induzida por estenose aórtica, não aumentou a atividade das enzimas do metabolismo energético (creatina quinase, citrato sintase, citocromo c oxidase e lactato desidrogenase) do músculo gastrocnêmio (MOMKEN, KAHAPIP, BAHÍ, BADOUAL, HITTINGER, VENTURA-CLAPIER & VEKSLER, 2003).

O acionamento precoce do metabolismo anaeróbio associado a alterações intrínsecas da musculatura está relacionado à redução do processo de fosforilação oxidativa que por sua vez pode dever-se à elevada produção de óxido nítrico, um inibidor dessa via (SCHULZE et al., 2002). Ou ainda ao menor fornecimento de hidrogênios devido à redução da atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ou ciclo de Krebs), pois o mais proeminente achado quanto a enzimas mitocondriais é uma redução na atividade da enzima citrato sintase que embora não seja uma enzima chave, constitui-se numa enzima fundamental do ciclo de Krebs (BRUNOTTE, THOMPSON, ADAMOPOULOS, COATS, UNITT, LINDSAY, KAKLAMANIS, RADDA

& RAJAGOPALAN, 1995; DELP, DUAN, MATTSON & MUSCH, 1997; SIMONINI, LONG, DUDLEY, YUE, MCELHINNY & MASSIE, 1996). A menor atividade do ciclo de Krebs, portanto, poderia justificar parte do comprometimento metabólico da IC. O menor estoque de creatina fosfato (CP) também parece ser uma das importantes modificações intrínsecas da musculatura esquelética que acabam comprometendo a capacidade funcional. Tanto a alteração da fosforilação oxidativa como a redução do estoque de CP *per se*, são capazes de comprometer a capacidade da fibra muscular ressintetizar ATP por meio do metabolismo aeróbio. Em relação ao menor estoque de CP, foi demonstrado que o transporte de ATP das mitocôndrias (sítio da fosforilação oxidativa) até a miosina ATPase é realizado por esse fosfagênio (WILLIAMS, KREIDER & BRANCH, 1999) o que explicaria em parte a redução na fosforilação oxidativa. Na realidade, foram identificadas diferenças nítidas na taxa de CP para fosfato inorgânico (Pi) em portadores de IC quando comparados a indivíduos controles. Portanto, a caracterização de alterações enzimáticas (pelo estudo da atividade máxima das enzimas citrato sintase e hexoquinase) e as implicações dessas nos processos de transferência de energia (ex. por meio do teste da máxima fase estável do lactato sanguíneo) em camundongos KO será de grande valia e proverá informações para futuros estudos sobre os mecanismos que associam a cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática a prováveis efeitos deletérios na musculatura esquelética.

2.4.2 Alterações Estruturais da Musculatura Esquelética na Insuficiência Cardíaca

Dentre as modificações estruturais observadas em portadores de IC, destacam-se alterações no tipo de fibra muscular esquelética, como a redução da porcentagem de fibras do tipo I e o aumento de fibras do tipo II acompanhada pela mudança das isoformas da miosina de cadeia pesada (MHC) de MHC1 β (lenta e oxidativa) para MHC2a (rápida e oxidativa) e MHC2b (rápida e glicolítica) (LARSEN, LINDAL, AUKRUST, TOFT, AARSLAND & DICKSTEIN, 2002; PIEPOLI, SCOTT, CAPUCCI & COATS, 2001; SCHULZE et al., 2002; VESCOVO, 2002).

Uma outra condição determinante da redução da capacidade de exercício no portador de IC é a atrofia muscular. O aumento da morte celular por apoptose é responsável por essa perda de proteína muscular em portadores de IC (LIBERA, ZENNARO, SANDRI, AMBROSIO & VESCOVO, 1999). Vale destacar que tem sido demonstrado que células são mais susceptíveis à morte (seja por apoptose ou necrose) devido aos efeitos de agentes deletérios quando seu metabolismo está alterado (PAPADIMITRIOU, PHELPS, SHIN, SMITH & TRUMP, 1994; TIROSH, DEGANI & BERKE, 1984; WINTERS, MATTHEWS, ERCAL & KRISHNAN, 1994). Isso permite inferir que o aumento da apoptose pode ser devido ao fato de células musculares serem menos aptas a resistir a condições adversas presentes no organismo de indivíduos portadores de IC (ex. episódios constantes ou repetidos de disponibilidade inadequada de oxigênio ao músculo e exposição prolongada ao estímulo neurohumoral também inadequado) (LUNDE et al., 2001a). Também foi observado que a apoptose está associada a maior concentração de uma citocina pró-inflamatória conhecida por estar envolvida em processos de morte celular, o $TNF\alpha$. Na realidade trabalhos recentes demonstram que a apoptose pode estar associada a um desequilíbrio entre a concentração de citocinas pró-inflamatórias (ex. $TNF-\alpha$ e IL-1) capazes de aumentar o catabolismo e de citocinas anti-inflamatórias (IL-6) capazes de evitar o aumento do catabolismo. (LIBERA et al., 1999)

Além da menor capacidade metabólica e da alteração no balanço de citocinas pró- e anti-catabólicas, outras condições que parecem ser importantes para o estabelecimento da atrofia muscular em pacientes portadores de IC são as concentrações elevadas de catecolaminas (POEHLMAN, SCHEFFERS, GOTTLIEB, FISHER & VAITEKEVICIUS, 1994; SCHULZE et al., 2002), desequilíbrio na razão entre cortisol e dehidroepiandrosterona, concentrações elevadas de hormônio do crescimento (hGH) bem como resistência aos seus efeitos (ANKER et al., 1997; SCHULZE et al., 2002) e diminuição da expressão de IGF-I muscular e IGF-I circulante (HAMBRECHT, SCHULZE, GIELEN, LINKE, MOBIUS-WINKLER, YU, KRATZSCH, BALDAUF, BUSSE, SCHUBERT, ADAMS & SCHULER, 2002; SCHULZE et al., 2002). Vale destacar que a diminuição do IGF-I está associada à redução da aplicação de tensão contrátil na fibra muscular, que por sua vez é

reduzida progressivamente em pacientes com IC fazendo com que diminua cada vez mais esse fator de crescimento, caracterizando assim, um círculo vicioso (onde o comprometimento periférico leva a atrofia muscular e a redução da massa muscular reforça ainda mais a perda de proteína contrátil).

Em quadros mais avançados, além do comprometimento funcional de indivíduos portadores de IC, a excessiva perda de massa muscular pode culminar em caquexia. Essa condição pode estar presente em diferentes doenças sistêmicas, e acomete cinco milhões de pessoas nos EUA (MORLEY, THOMAS & WILSON, 2006). Quando a caquexia é oriunda da IC, costuma-se denominá-la *caquexia cardíaca*. Cerca de 20% dos pacientes com IC apresentam *caquexia cardíaca*, o que contribui para o mau prognóstico da síndrome (MORLEY, THOMAS & WILSON, 2006). Além disso, indivíduos portadores de IC quando caquéticos apresentam mortalidade aumentada, condição essa considerada como preditor independente de mortalidade. Nesses indivíduos, aumenta-se ainda mais o risco de mortalidade, quando a *caquexia cardíaca* é associada a uma diminuição do consumo de oxigênio de pico. Dessa forma, tem sido proposto, que a avaliação da caquexia deva ser incluída nos programas de transplantes, além de ser importante alvo para o tratamento dessa síndrome (ANKER et al., 1997).

De acordo com o exposto acima, a compreensão dos efeitos deletérios da IC no tecido muscular esquelético e a contribuição dessas alterações para a piora da síndrome pode contribuir substancialmente para a escolha de uma melhor abordagem para o tratamento da IC. No entanto, os modelos experimentais que induzem IC nem sempre consistem nas melhores ferramentas utilizadas para o entendimento da evolução da miopatia esquelética ao longo do desenvolvimento da IC, visto que, quase sempre nesses modelos a doença é induzida de forma dramática e rápida. Dessa forma, a utilização de modelos que se assemelhem o mais próximo das condições observadas em humanos, é de fundamental importância. Camundongos KO constituem-se em um modelo de cardiomiopatia por hiperatividade simpática, semelhante à observada em pacientes com IC. Portanto, para que o potencial desse modelo possa ser utilizado em abordagens preventiva e terapêutica para a IC, é importante a realização da caracterização fenotípica da musculatura

esquelética. Mediante a isso, neste projeto foram estudados diferentes períodos ao longo do desenvolvimento da IC: aos três meses de idade, no qual a cardiomiopatia encontra-se numa fase precoce e em dois intervalos específicos ao longo de sua progressão (cinco meses, no qual o comprometimento é moderado e sete meses, no qual o comprometimento é grave observando-se cerca de 50% de mortalidade e edema pulmonar). É importante destacar que esses intervalos não foram selecionados aleatoriamente, eles foram escolhidos com base em estudo prévio realizado pela Profa Dra Patrícia Chakur Brum em seu estágio de Pós Doutorado na Universidade Stanford que acompanhou a taxa de mortalidade em camundongos controle (WT) e KO no período de um ano (FIGURA 1).

FIGURA 1 - Taxa de sobrevivência em camundongos controle (WT, n=30) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO, n=90) ao longo de 12 meses (BRUM et al., 2002).

A hipótese testada no presente estudo é a de que animais com deleção dos genes para os receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos desenvolverão alterações estruturais,

bioquímicas e funcionais na musculatura esquelética semelhantes às observadas na IC. Essas alterações serão mais proeminentes na fase em que a cardiomiopatia é grave e associada à alta taxa de mortalidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Sabe-se que o comprometimento da capacidade funcional causado pela IC não está limitado somente ao sistema cardiovascular, pois parte desta redução é decorrente das alterações no músculo esquelético. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização estrutural, bioquímica e funcional do músculo esquelético em camundongos KO aos três, cinco e sete meses de idade.

3.2 Específicos

Avaliar em camundongos WT e KO em diferentes idades:

- a curva de sobrevida no período do estudo;
- a atividade locomotora espontânea aos 3 e 7 meses;
- a tolerância à realização de esforço em esteira rolante;
- a máxima fase estável do lactato sangüíneo (MFEL);
- o comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca no repouso;
- a função ventricular;
- a composição corporal;
- a distribuição dos tipos de fibras musculares esqueléticas nos músculos sóleo e plantar;
- a área da secção transversa dos diferentes tipos de fibras nos músculos sóleo e plantar;

- a capacidade metabólica oxidativa e glicolítica;
- a razão capilar por fibra dos músculos sóleo, plantar e porção branca do músculo gastrocnêmio;
- a concentração de noradrenalina circulante.

A seguir, será apresentado no QUADRO 2, o resumo dos experimentos e a ordem em que foram realizados neste projeto. Importante esclarecer que os experimentos foram realizados à medida que os animais atingissem a faixa etária desejável (três, cinco e sete meses).

QUADRO 2 - Resumo da metodologia executada para o desenvolvimento deste projeto.

<p>Procedimentos que antecederam o Sacrifício</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Genotipagem; - Identificação dos animais; - Teste de tolerância ao esforço; - Determinação da MSSL; - Registro indireto da FC e PAS por esfigmomanômetro de cauda; - Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma; - Avaliação da atividade locomotora espontânea; - Pesagem corporal; - Avaliação indireta da composição corporal pelo DEXA; - Acompanhamento da curva de sobrevida no período do estudo.
<p>Procedimentos após o Sacrifício</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Razão peso úmido/seco dos músculos sóleo e plantar; - Tipagem de fibras pela técnica da reação histoquímica para miosina ATPase nos músculos sóleo e plantar; - Análise da razão capilar por fibra muscular nos músculos sóleo, plantar e porção vermelha do gastrocnêmio; - Dosagem da atividade máxima da enzima citrato sintase e hexoquinase nos músculos sóleo, porção branca e porção vermelha do gastrocnêmio; - a concentração de noradrenalina circulante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Para a realização do presente projeto de pesquisa foram utilizados camundongos machos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos (KO) e camundongos controle (WT), linhagem C57/BL6, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Os camundongos utilizados neste estudo foram mantidos no Biotério do laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício na Escola de Educação Física e Esporte da USP (EEFEUSP), com temperatura controlada entre 22 e 25°C, e ciclo claro-escuro invertido 12:12h, com início do período escuro às 7h da manhã e início do período claro às 19h. A inversão do ciclo claro-escuro foi realizada por um *timer* instalado na sala do Biotério. Água e comida (Nuvilab[®] Nutrientes Ltda) foram administradas *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)³. O projeto de pesquisa intitulado: Caracterização fenotípica do músculo esquelético na cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática, foi aprovado pelo Comitê de Ética da EEFEUSP (nº 058) na data de 06/08/2004.

4.2 Identificação dos animais

Os animais utilizados neste estudo foram subdivididos de acordo com o seu genótipo (WT e KO) e faixa etária (três, cinco e sete meses), totalizando seis grupos. Para a identificação dos animais, utilizou-se um dispositivo introduzido sobre a pele no dorso, após anestesia com anestésico volátil (halotano 1 %, com fluxo de 1

³ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

l/min). Cada dispositivo continha um código com letras e números, o qual foi identificado por leitor automático.

4.3 Genotipagem

Para a genotipagem dos camundongos KO, foi extraído DNA genômico pela biópsia realizada na orelha esquerda dos animais. O procedimento padrão para extração do DNA genômico consiste na digestão do tecido com proteinase K e precipitação do DNA com isopropanol.

A genotipagem é realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) em termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) à jusante (*sense*) e à montante (*antisense*) do sítio de inserção do gene que confere resistência a neomicina (*neo*). A amplificação do fragmento gênico de DNA permite a identificação dos genes intactos (WTC ou WTA *sense* e *antisense*) e com deleção dos genes dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos (*Neo/sense* e *WT antisense*).

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2A} -adrenérgicos:

WTA sense: 5' CTG CTC ATG CTG TTC ACA GTC ATT TG 3'

WTA antisense: 5' CCA CAC GGT GAC AAT GAT GGC CTT 3'

Neo/sense: 5' CGA GAT CCA CTA GTT CTA GCC TCG 3'

Oligonucleotídeos para genotipagem dos receptores α_{2C} -adrenérgicos:

WTC sense: 5' CAT CTT GTC CTC CTG CAT AGG CTC 3'

WTC antisense: 5' TCT CAT CCG GCT CCA CTT CAG TG 3'

Neo/sense: 5' GGG AGG ACA ATA GCA GGC ATG CTG 3'

4.4 Avaliação Cardiovascular em Repouso

4.4.1 Registro indireto da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

A medida indireta da pressão arterial sistólica foi realizada por método de esfigmomanômetro de cauda utilizando um sistema específico para camundongos (*Visitech, Inc, Apex, N.C.*), composto por quatro caixas restritoras (três centímetros de largura e três centímetros e meio de altura) montadas sob uma superfície aquecida (FIGURA 2).

A cauda dos animais passou através dos manguitos e foi fixada com fita adesiva entre a fonte de luz e o fotorresistor localizados acima e abaixo da cauda, respectivamente. Avaliado fotoeletricamente, o fluxo sangüíneo nas caudas produz ondas oscilatórias que foram digitalmente registradas duzentas vezes por segundo por canal, e analisadas antes e durante uma rotina programável de inflagem e desinflagem do manguito. Os valores médios de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso foram obtidos após cada rotina do equipamento.

Para a determinação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso foram consideradas a média de dez registros consecutivos realizados no mesmo dia. Os animais foram registrados em três dias diferentes da semana, sendo ulteriormente calculada a média dos valores obtidos.

FIGURA 2 - Sistema para registro indireto de pressão arterial sistólica caudal e frequência cardíaca em camundongos.

4.4.2 Ecocardiograma

A avaliação da função ventricular foi realizada pelo ecocardiograma. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN, DEMARIA, KISSLO & WEYMAN, 1978). É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as dimensões e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmada em uma série de estudos (GUAZZI, PALERMO, PONTONE, SUSINI & AGOSTONI, 1999; NIENABER, TACHIBANA, NAGA PRASAD, ESPOSITO, WU, MAO & ROCKMAN, 2003; SANTOS, CASTRO, GAVA, PINHEIRO, ALMEIDA, PAULA, CRUZ, RAMOS, ROSA, IRIGOYEN, BADER, ALENINA, KITTEN & FERREIRA, 2006).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado nos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Os exames foram realizados por um único observador muito bem treinado em realizar ecocardiograma em camundongos. Para cada exame realizado foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas variáveis.

O exame ecocardiográfico foi realizado nos animais sob anestesia com halotano em fluxo contínuo de oxigênio misturado ao anestésico, mantendo a frequência cardíaca em valores semelhantes entre os grupos para evitar influência da mesma sobre os índices de contratilidade cardíaca (FIGURA 3A). O animal foi anestesiado, em seguida realizou-se a tricotomia e então foi colocado em decúbito dorsal para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (*ACUSON Corporation, Mountain View, CA*) (FIGURA 3B), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de cerca de 14 MHz, para a otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (*General Imaging Gel, ATL. Reedsville, USA*). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (*Sony SVO-9500 MD*) e em papel fotográfico geradas através da impressão colorida (*Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU*). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) em

nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDiaVE) e sistólico (DSisVE) do ventrículo esquerdo, a espessura do septo interventricular na diástole (SIVDia), a espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis) e diástole (PPDia). A partir dessas medidas, foram calculadas a fração de encurtamento (FS) e a fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo.

FIGURA 3 - Avaliação Ecocardiográfica. (A) Animal anestesiado com halotano durante a avaliação. (B) Equipamento utilizado para avaliação Ecocardiográfica (SEQUOIA 512). (C) Análise ecocardiográfica em modo monodimensional realizada em camundongos. 1- Espessura do septo interventricular na diástole; 2- Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; 3- Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; 4- Espessura do septo interventricular na sístole; 5- Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; 6- Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole.

4.5 Avaliação da Capacidade Física

4.5.1 Teste de tolerância ao esforço

A intolerância à atividade física, relacionada à fadiga precoce, é uma característica recorrente nos pacientes com IC e é freqüentemente o maior sintoma limitante (SIMONINI et al., 1996). Alterações no tecido muscular esquelético estão mais relacionadas ao quadro intolerância nesses pacientes, do que a diminuição da capacidade funcional do coração, o que faz deste teste um bom preditor para a função muscular esquelética nesta síndrome (LUNDE, SEJERSTED, THORUD, TONNESSEN, HENRIKSEN, CHRISTENSEN, WESTERBLAD & BRUTON, 2006).

A capacidade (máxima) de realização do exercício físico foi estimada pelo teste progressivo até a exaustão em esteira rolante (FERREIRA, ROLIM, GRANÁ, BARTHOLOMEU & BRUM, 2004). Foi realizado um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de seis m/min, sem inclinação. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de três m/min até a exaustão do animal, ou seja, o teste terminava quando o animal não conseguia manter o padrão da corrida. As variáveis medidas foram a velocidade final (m/min) e a distância total percorrida (metros) por cada animal durante o teste máximo.

4.5.2 Determinação da máxima fase estável do lactato sangüíneo

A determinação da máxima fase estável do lactato sangüíneo (MFEL), ou seja, a maior concentração de lactato possível de ser mantida em *steady-state*, representa a intensidade máxima de exercício físico na qual a capacidade de remoção de lactato sangüíneo permite compensar sua produção. Ou seja, o animal realiza o exercício físico com predomínio da via metabólica aeróbia. A partir desta medida, foi observado se a antecipação da fadiga periférica esta associada à produção de lactato no músculo esquelético em camundongos KO. (HECK, MADER, HESS, MUCKE, MULLER & HOLLMANN, 1985);(FERREIRA et al., 2004).

A partir da determinação da velocidade final do teste progressivo até a exaustão (item 4.5.1) foram estabelecidas três velocidades sub-máximas, por meio de três testes aleatórios de cargas independentes com intervalos de 48 horas entre os testes. O esquema detalhado do teste pode ser observado na FIGURA 4A.

A coleta da amostra sangüínea, via artéria caudal (FIGURA 4B), foi realizada no repouso e a cada sete minutos de teste em esteira rolante (FIGURA 4C). Foram coletados 25 µl de amostra de sangue em tubo capilar heparinizado. As amostras foram, imediatamente diluídas em solução de fluoreto de sódio a 1% com volume final de 50 µl. A concentração do lactato sangüíneo foi analisada pelo método eletroquímico em aparelho *YSL 2300 Yellow Spring CO*.

A máxima fase estável do lactato foi identificada como a velocidade da esteira, em que não houvesse variação na concentração de lactato maior que 1mmol/L do 7º aos 28º minuto de teste.

FIGURA 4 - (A) Esquema do teste da MFEL. (B) Coleta de sangue para análise do lactato. (C) Teste em esteira rolante para a determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo.

4.6 Avaliação da Composição Corporal

4.6.1 Massa corporal

O controle ponderal foi realizado por balança *GEHAKA*® durante o período do estudo, no início de cada semana e antes do sacrifício.

4.6.2 Razão peso úmido/seco do músculo esquelético

A razão peso úmido/seco foi usada como um indicativo da alteração da massa muscular que pode ser resultante da atrofia muscular esquelética, sendo comumente observada em portadores de IC.

Após o sacrifício, os músculos sóleo e plantar foram removidos, pesados (peso úmido) e colocados em estufa a 37 °C, após 48h os músculos foram novamente pesados (peso seco). A partir desses valores foi obtida a razão peso úmido/seco dos músculos estudados.

4.6.3 Medida indireta da composição corporal por DEXA

A medida indireta da composição corporal foi realizada por *dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA) em equipamento *pDEXA*® *Sabre Bone Densitomer* (FIGURA 5A). Esse método baseia-se na análise computadorizada da atenuação de um feixe puntiforme de raio-X, emitido por uma fonte móvel, constituído por fótons de duas energias distintas, 38 e 70 Kev. Durante a realização do exame, um detector, movendo-se juntamente com a fonte de raio-X, faz a amostragem dos fótons que passam através de qualquer estrutura colocada entre a fonte e o detector. Um *software* calcula a densidade de cada amostra a partir da equação de transmissão de fótons (MAZESS, BARDEN, ETTINGER, JOHNSTON, DAWSON-HUGHES, BARAN, POWELL & NOTELOVITZ, 1987). A utilização dos dois níveis de energia permite a distinção entre a densidade dos tecidos mineralizados e tecidos moles, minimizando erros que resultam da irregularidade da distribuição dos tecidos moles pelo corpo. Os resultados obtidos são comparados com um padrão de densidade conhecida, como

descrito adiante. Esses dados são utilizados na construção de uma imagem que permite a identificação e análise de regiões de interesse. As grandezas medidas pelo DEXA são a massa gorda, massa isenta de gordura e conteúdo mineral ósseo, expressos em gramas, e a área óssea, expressa em cm^2 . No presente estudo, utilizamos o DEXA para quantificar a massa gorda e a massa isenta de gordura do corpo posterior, que correspondeu dois terços acima da crista ilíaca superior até a quinta vértebra caudal (excluindo a cauda) (FIGURA 5B). Para esse cálculo, dois terços, foi preciso primeiro medir o comprimento do quadril pelos limites da crista ilíaca superior até a espinha ilíaca inferior (FIGURA 5C). Para a realização dos exames, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilasina e quetamina (15 e 90 mg/kg de peso corporal, respectivamente) administrada i.p. Os camundongos foram colocados no densitômetro na posição pronada com os membros posteriores abduzidos e o quadril, joelhos e calcanhares flexionados a 90 graus. O equipamento foi ajustado em meio milímetro por um milímetro e velocidade da fonte e detector de raio X foi ajustada em oito milímetros por segundo. Nesse ajuste, cada exame foi completado em um período aproximado de 30 minutos. O uso de qualquer método de densitometria necessita que o sistema seja calibrado a partir de um padrão conhecido, de forma que os valores encontrados em animais ou pacientes possam ser interpretados de forma confiável. Os sistemas de medida por DEXA são calibrados para o conteúdo mineral ósseo a partir de conteúdos minerais conhecidos. A calibração da área é feita contra cilindros de diâmetros conhecidos. Há a necessidade de se realizar testes de qualidade e segurança, ou seja, de se verificar se o sistema permanece calibrado ao longo do tempo. Para tanto, foram realizadas medidas diárias de um bloco padrão composto por três câmaras sintéticas de constituição semelhante a do osso, com área e conteúdo mineral conhecidos. Essas medidas têm uma duração média de 10 a 15 minutos. Essa medida foi realizada em colaboração com a Profa Dra Cecília Gouveia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédica da USP.

Além da medida indireta da composição corporal, no dia do sacrifício, também foi mensurado diretamente o peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal dos grupos estudados.

A

B

C

FIGURA 5 - Avaliação indireta da composição corporal. (A) Equipamento utilizado para avaliação da composição corporal (pDEXA® Sabre Bone Densitomer). (B). Medida do comprimento do quadril para o cálculo dos 2/3 acima da crista ilíaca. (C) Medida do corpo posterior.

4.7 Avaliação da atividade locomotora espontânea de camundongos observados em campo aberto

Existem grandes discussões na literatura em relação às alterações musculares envolvidas na IC, pois há dúvidas se a alteração periférica ocorre em função do menor “uso” da musculatura esquelética frequentemente associado a diminuição da atividade física, ou se a IC *per se* leva à tais modificações (SCHULZE et al., 2002; SIMONINI et al., 1996). Dessa forma, o estudo da atividade locomotora espontânea é fundamental para a caracterização muscular esquelética no modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática.

Uma das formas mais utilizadas para a medida da atividade locomotora de roedores é por observação direta dos parâmetros de locomoção no aparelho campo aberto. A observação direta dos animais, apesar de ser mais trabalhosa, se constitui em uma forma de avaliação mais sensível e confiável para a atividade locomotora.

A atividade locomotora espontânea dos camundongos foi avaliada por meio de observação direta do experimentador em um campo aberto modificado (BROADHURST, 1960). Este aparelho é constituído de um campo quadricular de madeira com 60 cm de altura por 60 cm de largura, pintado de branco e com uma abertura frontal que permite ao observador uma visão global do animal. O fundo desse campo é dividido por 36 quadrantes (FIGURA 6A).

Para as observações, cada animal foi colocado individualmente no centro do campo, cada sessão durou cinco minutos e as avaliações foram feitas minuto a minuto. Com finalidade de homogeneizar a situação experimental, o campo-aberto foi limpo com uma solução de álcool a 5% antes de cada sessão. Esse procedimento visou eliminar possíveis odores emitidos por animais previamente avaliados. As observações dos camundongos WT e KO foram intercaladas sempre que possível e conduzidas entre 14:00 e 17:00 horas para evitar possíveis interferências do ciclo circadiano. A escolha randômica dos animais estudados foi realizada por um técnico do laboratório, sendo que o avaliador estava cego para o genótipo dos mesmos.

Os parâmetros observados e registrados no campo-aberto representam categorias comportamentais do repertório do animal nesse aparelho. São elas:

Locomoção: o animal, com o tronco afastado do chão por meio de movimentos alternado das quatro patas, levantando-se e voltando a apoiá-las em outro local, desloca-se horizontalmente sobre o fundo do campo-aberto. Uma unidade de medida corresponde ao ato do animal penetrar com as quatro patas, em uma das divisões do fundo do campo.

Levantar: Uma unidade de medida corresponde ao ato do animal apoiar-se apenas nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo perpendicular em relação ao chão do campo, tocando ou não as paredes laterais com as patas anteriores (FIGURA 6B).

Esse estudo foi realizado em colaboração com a Profa Dra Silvana Chiavegatto do Instituto do Coração.

FIGURA 6 - Foto do aparelho Campo Aberto (A). Foto do camundongo durante a realização da variável comportamental levantar (B).

4.8 Sacrifício e coleta dos tecidos

Após 24h do término do protocolo experimental, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram coletados sangue, glândulas adrenais, pulmões, fígado, baço, rins, os músculos sóleo, gastrocnêmio e plantar esquerdo, (o peso total de cada víscera foi corrigido pelo peso corporal e comparado entre os grupos) além do peso dos tecidos adiposos retroperitonal e epididimal (que auxiliaram na estimativa da gordura corporal).

O sangue foi centrifugado para separação do plasma e mantido em freezer -80 °C para ulterior processamento e realização do experimento para análise das concentrações de noradrenalina.

Os músculos gastrocnêmio foram separados em suas porções branca e vermelha, em seguida, congelados em nitrogênio líquido e guardados em freezer a -80 °C, bem como o plasma.

Os músculos da loja posterior da pata direita: plantar, sóleo e gastrocnêmio foram congelados em nitrogênio líquido como descrito no item 4.9, e mantidos em nitrogênio até a realização da reação histoquímica para a determinação dos tipos de fibras musculares e densidade capilar.

4.9 Avaliação da Caracterização Bioquímica do Músculo Esquelético

Alterações metabólicas no músculo esquelético em decorrência da IC já vêm sendo descritas como um dos marcadores desta síndrome. Parte desta desordem metabólica é causada pelo aumento da proporção de fibras do Tipo II, diminuição da densidade e tamanho de mitocôndrias e diminuição da atividade oxidativa. Para a realização da caracterização bioquímica no modelo de IC por hiperatividade simpática, foi avaliada a atividade máxima da enzima hexoquinase, sendo um representante da via glicolítica, e da citrato sintase, enzima da via oxidativa, em diferentes músculos esqueléticos.

4.9.1 Processamento dos tecidos

O sóleo, a porção vermelha e a porção branca do músculo gastrocnêmio de cada animal foram processados em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-HCl (50mM) e EDTA (1mM). Os tecidos foram homogeneizados em ultra-som (*Vibra CellsTM* - *Sonics & Materials, Connecticut, EUA*), durante 30 segundos a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 1000 g por um minuto e o sobrenadante utilizado para realização da cinética enzimática.

4.9.2 Hexoquinase (EC 2.7.1.1)

A hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose, na primeira reação da via glicolítica. A atividade da enzima foi determinada segundo o método descrito por

CRABTREE & NEWSHOLME (1972) (CRABTREE & NEWSHOLME, 1972) que se baseia na formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose e sua conversão em 6-fosfogliconato em reação catalisada pela enzima glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) (adicionada ao meio). Esta reação forma Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida (NADPH) em quantidade proporcional à atividade da hexoquinase e foi determinada a 340nm, durante 10 minutos, a 25 °C por espectrofotômetro (*Ultrospec 3100 pro da Amersham Pharmacia Biotech*).

A enzima catalisa a reação:

O meio de ensaio constitui-se de Tris-HCl (75 mM), $MgCl_2$ (7,5 mM), EDTA (0,8 mM), KCl (1,5 mM), mercaptoetanol (4 mM), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato ($NADP^+$) (0,4 mM), Adenosina Trifosfato (ATP) (2,5 mM), glicose (1 mM), creatina-fosfato (10 mM), creatina-quinase (1,8 U/mL), glicose-6-fosfato desidrogenase (1,4 U/mL), Triton X-100 0,05% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de D-glicose ao meio em concentração final de 1 mM. O resultado da atividade da enzima foi expresso em $nmol \cdot min^{-1} \cdot prot^{-1}$.

4.9.3 Citrato sintase (EC 4.1.3.7)

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio. A citrato sintase é uma enzima importante, pois ela catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação do acetil coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato para formar citrato e coenzima A (CoA). É uma enzima reguladora, e em muitos tipos de células, a reação por ela catalisada é o passo limitante na velocidade de todo o ciclo de

Krebs, e conseqüentemente na formação de energia via metabolismo aeróbio (LEHNINGER, 1991).

A enzima catalisa a reação:

A atividade máxima da enzima foi determinada por espectrofotômetro (*Ultrospec 3100 pro da Amersham Pharmacia Biotech*) segundo ALP & ZAMMIT (1976) (ALP, NEWSHOLME & ZAMMIT, 1976), a partir de quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) com o ácido 5,5'ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio consistiu de Tris-Base (100 mM), EDTA (1 mM), DTNB (0,2 mM), acetil-CoA (0,1 mM) e Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (0,5 mM) ao meio e a leitura e foi realizada a 25°C, durante um intervalo de 10 minutos, em 412 nm. O resultado da atividade da enzima foi expresso nmol.min⁻¹. prot⁻¹..

4.9.4 Determinação da quantidade de proteína

A quantificação de proteína no homogenato foi realizada segundo o método de BRADFORD (1976) (BRADFORD, 1976). Neste ensaio, as proteínas da amostra são complexadas com o corante azul de *coomassie brilhante G-250*. A reação é colorimétrica e a absorbância é medida a 595 nm. Os resultados de absorbância obtidos são lançados na equação da reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina (1 a 10 g/ml), repetida a cada determinação enzimática. A concentração da solução padrão de albumina é aferida antes da preparação de cada curva, dividindo-se o valor de absorbância obtido em 280 nm por 0,66. O resultado da atividade da enzima foi expresso em nmol.min⁻¹.mg de tecido e por nmol.min⁻¹.prot⁻¹.

4.10 Avaliação da Caracterização Histoquímica do Músculo Esquelético pela Reação Histoquímica para Miosina ATPase

Para a realização desse método, os músculos sóleo, gastrocnêmio e plantar (toda a loja posterior) foram extraídos juntos, cuidadosamente e fixados em fatias de fígado, para manter o tecido na posição correta pré-congelamento, pela região tendinosa (FIGURA 7).

FIGURA 7 - Extração do tecido. Retirada a loja posterior (A), foi realizado um corte transversal com uma lâmina nova sobre uma base de cera dental (B). Este corte foi importante para a penetração do isopentano no tecido durante o momento do congelamento. Em seguida, foi colocada uma massa de fígado sobre uma placa que identificou a amostra (C). A loja posterior foi colocada sobre a massa de fígado (D) que serviu como apoio para o tecido permanecer na posição correta durante o congelamento.

Posteriormente à fixação no fígado, a loja posterior foi mergulhada em isopentano, crioprotetor que evita artefatos nas amostras, e em seguida congelado em nitrogênio líquido onde foi mantida até que os cortes fossem realizados (FIGURA 8).

FIGURA 8 - Congelamento e cortes de tecidos. Para o congelamento, foi usado isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Quando o isopentano ficou com a base congelada, o tecido foi imerso (A). O fragmento foi introduzido no isopentano durante 10 segundos (B e C) e posteriormente colocado em outro tubo falcon de 50 de ml contendo nitrogênio líquido. Os tecidos foram conservados em nitrogênio líquido onde a temperatura é de aproximadamente -196 °C (D). Para os cortes, mantidos à temperatura média de 25 °C, foi utilizado Criostato Mícron® HM505E, onde foram feitos cortes seriados na espessura de 10 µm (E).

Após a obtenção dos cortes foram realizadas reações adaptadas de BROOKE & KAISER (1970) (BROOKE & KAISER, 1970), que permitiram a avaliação da atividade da enzima miosina ATPase por soluções com diferentes pHs (4,3 e 10,3).

Para a reação em pH 10,3, os cortes foram fixados a 4 °C em formol cálcio de Backer (50 ml de formalina 10% e 0,5 g de cloreto de cálcio), posteriormente foram lavados com água destilada e pré-incubados por 10 min em tampão glicina (0,75 g de glicina, 0,59 g de NaCl, 0,8 g de CaCl₂, 100 ml de água destilada e 90 ml de NaOH 0,1 M, pH 10,3).

Para reação em pH 4,3, os cortes não fixados, foram incubados em tampão acetato (44 ml de acetato de sódio 0,2 M, 50 ml de 1,2% ácido acético glacial, 200 ml de água destilada e 530 mg de CaCl₂, pH 4,3) durante 10 min.

Após a incubação dos cortes em diferentes soluções a metodologia seguiu de forma idêntica para as duas reações, como segue-se:

Os cortes, após a incubação, foram lavados em água destilada e posteriormente, incubados em solução contendo 60 ml de tampão glicina e 100 mg de ATP- Na_2 , pH 9,5 por 35 min a 37 °C, em seguida foram enxaguados com água destilada e mantidos em cloreto de cobalto 2% por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram mantidos em solução 0.5% de sulfeto de amônio por três minutos, sendo finalmente enxaguados com água destilada e montados com gelatina-glicerina.

Essa avaliação foi realizada em colaboração do Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

4.10.1 Determinação da área de secção transversa e tipo de fibras musculares

A captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por um programa de imagens (Leica Qwin).

Os músculos sóleo e plantar foram identificados conforme descrito por SPURWAY (1981) (SPURWAY, 1981) (FIGURA 9A, 9B e 9C). Não foram atribuídos números de campos para a análise, pois a avaliação foi realizada no tecido inteiro. Essa conduta foi importante, pois, como observado na FIGURA 9D o músculo plantar apresenta maior predomínio de fibras do Tipo IIA em nível mais profundo do que na superfície muscular. Dessa forma, a utilização de campos poderia inferir em uma quantificação de fibras inadequada.

A realização da quantificação e medida da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar foi realizada por um único observador, por meio do programa *Image-Pro Plus*.

Para a identificação dos subtipos de fibras, em cortes seriados processados em diferentes pHs, 4,3 e 10,3, foi realizada a comparação entre as colorações obtidas nesses ensaios segundo as observações de (HAMALAINEN &

PETTE, 1993). A classificação dos tipos de fibras atribuída pela coloração está exemplificada na FIGURA 10.

4.10.2 Determinação da área de secção transversa do músculo plantar

A captura das imagens foi realizada com magnificação de 50x (FIGURA 9D). A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por um programa de imagens (*Leica Qwin*). Foram realizadas no mínimo três medidas da área de seção transversa dos cortes seriados de uma mesma lâmina, e posteriormente, feita a média dos valores obtidos. Os resultados foram expressos em μm^2 .

FIGURA 9 - Disposição dos músculos sóleo (S), plantar (P), porção vermelha do gastrocnêmio (PV) e porção branca do gastrocnêmio (PB), nos diferentes pHs: 10,3 (A) e 4,3 (B). Figura adaptada de (SPURWAY, 1981), indicação dos músculos S, P, gastrocnêmio medial (GM) e gastrocnêmio lateral (GL) (C). Disposição dos diferentes tipos de fibras do músculo plantar, da superfície muscular até a região mais profunda (D).

A	pH 4,3	pH 10,3
Tipo I	●	○
Intermediária (Inter)	○	●
Tipo IIA	○	●

B

C

FIGURA 10 - Classificação dos diferentes subtipos de fibras musculares. (A) Escala de coloração atribuída para cada tipo de fibra no pH 4,3 e 10,3 (C). Exemplo da classificação dos tipos de fibras do músculo sóleo nos diferentes pHs: 4,3 (B) e 10,3 (C).

4.10.3 Análise da razão capilar por fibra muscular

Por meio da reação histoquímica para miosina ATPase no pH 10,3, em uma magnificação maior (400x), foi avaliada a razão capilar por fibra (sóleo, plantar e porção branca do gastrocnêmio) e a razão capilar por tipo de fibra (sóleo e plantar). Para essa análise foi utilizado no mínimo três campos e no máximo cinco campos, pois em músculos pequenos como o sóleo nem sempre é possível à obtenção de número maior de campos totalmente preenchidos (FIGURA 11).

FIGURA 11 - Capilarização em diferentes músculos: sóleo (A), plantar (B) e porção branca do gastrocnêmio (C).

4.11 Determinação da concentração de noradrenalina circulante

A concentração plasmática de noradrenalina tem sido utilizada na prática clínica como um indicador da atividade simpática periférica (ESLER, 1995; ESLER, JENNINGS, BIVIANO, LAMBERT & HASKING, 1986). Essa avaliação foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Dulce Casarini, da Universidade Federal de São Paulo.

4.12 Curva de sobrevivência

Conforme identificado em estudo realizado anteriormente, os animais KO apresentam mortalidade em torno de 50% aos sete meses de vida. (BRUM et al., 2002) A fim de reproduzir esse resultado, foi realizado o acompanhamento da curva de sobrevivência em um grupo de 12 animais KO e 11 animais controle no período de seis meses.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

- A porcentagem de sobrevivência foi analisada pelo método estatístico *Kaplan-Meier*, no qual as mortes são registradas individualmente pelas

datas exatas. As curvas foram comparadas entre si por meio da aplicação do teste de *log-rank*, capaz de detectar diferenças nas probabilidades de sobrevida.

- As variáveis da avaliação da composição corporal, avaliação da capacidade física, avaliação da MFEL, avaliação cardiovascular, avaliação da caracterização histoquímica do músculo esquelético e da avaliação bioquímica do músculo esquelético foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (genótipo e idade). Em caso de significância foi adotado o *post-hoc* de Duncan (*Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA*);

Para todas as análises, foram adotados como nível de significância $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Será apresentado na presente seção os resultados do estudo realizado com camundongos WT e camundongos KO, subdivididos de acordo com a TABELA 1.

TABELA 1- Amostra utilizada e distribuição entre os grupos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO).

	WT			KO		
	3 meses	5 meses	7 meses	3 meses	5 meses	7 meses
n	41	35	46	31	29	46

5.1 Avaliação Cardiovascular em Repouso

5.1.1 Medidas hemodinâmicas

Para estudar o efeito da hiperatividade simpática nas medidas hemodinâmicas, foram avaliadas as variáveis pressão arterial e frequência cardíaca dos camundongos do grupo controle e camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos. Para isso foi utilizado o método de pletismografia de cauda.

5.1.1.1 Pressão arterial caudal

Os camundongos controle e KO não apresentaram diferença estatisticamente significativa na pressão arterial. Como pode-se observar na FIGURA 12, os valores de pressão arterial dos camundongos controle e KO foram semelhantes aos três, cinco e sete meses de idade. Esses resultados sugerem que os fatores idade e genótipo não influenciam o comportamento da pressão arterial dos camundongos.

FIGURA 12 - Comportamento da pressão arterial dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA).

5.1.1.2 Freqüência cardíaca

A FIGURA 13 mostra os valores de freqüência cardíaca de repouso dos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Os camundongos KO apresentaram valores de freqüência cardíaca significativamente superiores aos valores do grupo controle nas diferentes faixas etárias estudadas. Esses resultados sugerem que os camundongos KO apresentam taquicardia basal aos três, cinco e sete meses de idade. Vale a pena ressaltar que a taquicardia basal tem sido constantemente observada nesse modelo genético de hiperatividade do sistema nervoso simpático (BRUM et al., 2002). Além da taquicardia basal observada entre o grupo controle e o grupo KO, também pode-se constatar entre os camundongos KO aumento da freqüência cardíaca ao longo dos meses, no qual camundongos KO aos sete meses de idade apresentam freqüência cardíaca maior do que camundongos KO aos três e cinco meses de idade, e camundongos KO aos cinco meses de idade apresentam freqüência cardíaca maior do que camundongos

KO aos três meses de idade. Esse comportamento foi semelhante ao observado nas concentrações plasmáticas de noradrenalina.

* Diferença significativa vs. WT da respectiva faixa etária.

** Diferença significativa vs. KO 3 meses.

Diferença significativa vs. KO 5 meses.

FIGURA 13 - Comportamento da freqüência cardíaca em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.1.1.3 Concentrações de noradrenalina circulante

Para avaliar a hiperatividade nervosa simpática nos camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos, foram realizadas as dosagens das concentrações de noradrenalina circulante aos três, cinco e sete meses de idade.

As concentrações de noradrenalina plasmática de camundongos KO aos três meses de idade apresentaram uma tendência em elevação quando comparados aos camundongos do grupo controle, entretanto os valores não foram

estatisticamente significantes (FIGURA 14). Já aos cinco e sete meses de idade, os animais com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos apresentaram elevação significativa na concentração de noradrenalina plasmática em relação aos animais do grupo controle (FIGURA 14). Esses dados sugerem que os camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos apresentam diferentes concentrações de noradrenalina circulante aos três, cinco e sete meses de idade.

* Diferença significativa vs. WT da respectiva faixa etária.

** Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 14- Concentrações de noradrenalina plasmática de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.1.2 Medidas ecocardiográficas

Para constatar o desenvolvimento da cardiopatia no modelo de hiperatividade simpática, foram realizadas avaliações dos parâmetros funcionais cardíacos pela avaliação ecocardiográfica.

As FIGURAS 15A e 15B mostram um índice cardíaco que avalia a função sistólica dos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Conforme ilustrados na FIGURA 15A, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram uma diminuição da fração de encurtamento, que embora de pequena magnitude (16%), foi significativamente diferente quando comparada ao grupo controle. Aos sete meses de idade, essa disfunção sistólica se agravou ainda mais, onde foi observado redução de 34% da fração de encurtamento nos camundongos KO.

Quando avaliou-se a fração de ejeção (FIGURA 15B), foi observado que aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram uma diminuição de 16% quando comparados aos camundongos do grupo controle. Similar a fração de encurtamento, esta queda foi ainda mais acentuada aos sete meses de idade, onde observou-se uma diminuição de 28% da fração de ejeção dos camundongos KO.

Além da função sistólica, também foi analisado um parâmetro estrutural cardíaco, o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. Aos sete meses de idade os camundongos KO apresentaram um aumento significativo desse parâmetro quando comparados aos camundongos do grupo controle (FIGURA 15C). Esses dados sugerem que os camundongos KO apresentam dilatação do ventrículo esquerdo aos sete meses de idade associada à disfunção sistólica.

* Diferença significativa vs. grupos WT.

FIGURA 15 - Fração de encurtamento (A), fração de ejeção (B) e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (C) dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0.05$).

5.2 Curva de Sobrevida

A curva de sobrevida foi realizada ao longo de todo o período experimental, com o registro sendo feito a cada dia em que fora observado o óbito de algum dos animais. Mortes acidentais não foram registradas na curva, por orientação do próprio método. De acordo com a FIGURA 16, os camundongos KO apresentaram mortalidade acentuada a partir do quinto mês de idade (150 dias).

FIGURA 16 - Curva de sobrevida dos animais controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO).

5.3 Avaliação da Capacidade Física

5.3.1 Tolerância à realização de esforço

Um dos marcadores da IC é a intolerância à realização de esforço, que é definida como redução na habilidade de realizar exercício físico dinâmico devido a sintomas como dispnéia ou fadiga periférica. O teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante pode ser utilizado como importante ferramenta na avaliação da tolerância à realização de esforço físico em modelos animais

geneticamente modificados (BERNSTEIN, 2003). Sendo assim, visando avaliar a tolerância à realização de esforço físico, os camundongos controle e KO foram submetidos a este teste aos três, cinco e sete meses de idade.

A FIGURA 17A mostra os valores de distância total percorrida durante o teste de esforço físico em camundongos controle e KO nas diferentes faixas etárias estudadas. Como pode-se observar na figura, aos três e cinco meses de idade não houveram diferenças significantes na distância total percorrida no teste de tolerância ao esforço físico entre os grupos controle e KO. Já aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentaram uma significativa queda da distância total percorrida no teste em relação aos camundongos controle, caracterizando dessa forma a intolerância ao esforço físico nessa faixa etária.

O mesmo padrão foi observado na velocidade máxima atingida durante o teste de esforço físico (FIGURA 17B). Somente aos sete meses de idade observou-se redução da velocidade máxima atingida durante o teste de camundongos KO quando comparado ao grupo controle.

* Diferença significativa vs. WT 7 meses.

FIGURA 17 - Distância total percorrida (A) e velocidade máxima atingida (B) dos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.3.2 Determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo

A menor capacidade de realizar exercício físico observada em pacientes portadores de IC, é caracterizada pelo acionamento precoce do metabolismo anaeróbio (acúmulo de lactato) para uma dada intensidade de esforço (VESCOVO, 2002). Para avaliar se a intolerância à realização de esforço, observada nos camundongos KO aos sete meses de idade (FIGURA 17), está associada à antecipação da fadiga periférica pelo acúmulo de lactato nos camundongos KO, foi realizado testes de exercício prolongado com cargas independentes para a determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo (MFEL) em camundongos controle e KO. Ou seja, a MFEL é caracterizada pela maior concentração de lactato possível de ser mantida em *steady-state*, representando a maior intensidade de exercício físico na qual a capacidade de remoção de lactato sanguíneo permite compensar sua produção, dessa forma, o animal realiza o exercício físico prolongado com maior participação da via metabólica aeróbia.

Para ilustrar os resultados de um teste para a determinação da MFEL em cargas submáximas, previamente determinadas a partir dos resultados de um teste máximo, na FIGURA 18 será apresentado dados de camundongos controle (FIGURA 18A) e KO (FIGURA 18B) aos cinco meses de idade. A carga determinada como a MFEL, nos gráficos de linha, é representada pela linha preta cheia. Nesta figura, a MFEL foi atingida na velocidade de 15 m/min (FIGURA 18A) e 13 m/min (FIGURA 18B), uma vez que acima dessa intensidade não foi observado equilíbrio entre produção e remoção de lactato, havendo acúmulo do mesmo no sangue.

Na FIGURA 19, pode-se observar a intensidade do exercício físico (representada pela velocidade em m/min) em que ocorreu a MFEL nos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentaram a MFEL em uma intensidade de esforço menor quando comparado ao grupo controle da mesma faixa etária, e ao grupo KO aos três meses de idade.

* Diferença significativa vs. grupos.

FIGURA 18 - Determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo por meio de três cargas submáximas. (A) Camundongos controle (WT) e (B) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos cinco meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de um fator (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. WT 7 meses.

Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 19 - Velocidade atingida na máxima fase estável do lactato sangüíneo pelos camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.4 Avaliação da Composição Corporal

5.4.1 **Massa corporal**

Para a avaliação da composição corporal do modelo genético de IC por hiperatividade simpática, foi realizada a avaliação de parâmetros direto e indireto. Um parâmetro indireto, a massa corporal, foi avaliada nos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Na TABELA 2 pode-se observar que os animais KO apresentam redução da massa corporal em relação ao grupo controle estatisticamente significativa aos sete meses de idade. Diferença essa não observada

aos três meses de idade. Vale a pena ressaltar que ambos os grupos aumentaram a massa corporal com o passar do tempo.

5.4.2 Medida indireta da composição corporal por DEXA

Outro parâmetro indireto avaliado foi à estimativa de massa gorda e massa isenta de gordura nos camundongos controle e KO por meio de densitômetro (*dual energy x-ray absorptiometry*). Essa avaliação somente foi realizada nos grupos com sete meses idade, pois houve problemas com equipamento inviabilizando a avaliação nos demais grupos. Nessa faixa etária observou-se, que camundongos KO apresentam diminuição da massa gorda e aumento da massa isenta de gordura quando comparado ao grupo controle (TABELA 2).

5.4.3 Massa dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal

Um parâmetro direto da avaliação da composição corporal consistiu na mensuração da massa dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal de camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. O grupo KO apresentou diminuição do tecido adiposo retroperitoneal em todas as faixas etárias estudadas quando comparado ao grupo controle (TABELA 2). No entanto, o tecido adiposo epididimal não diferiu entre os grupos estudados.

5.4.4 Razão peso úmido e peso seco do músculo esquelético

O peso úmido, peso seco e sua razão foram usados como um indicativo da alteração da massa muscular que pode ser resultante da atrofia ou da apoptose do músculo esquelético na presença da cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática. Esses valores também indicam a quantidade de água muscular (peso úmido) e a quantidade de proteína muscular (peso seco). Na TABELA 3 pode-se observar os resultados referentes aos músculos sóleo e plantar.

No músculo sóleo de camundongos KO não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no peso úmido, peso seco e na razão peso úmido/peso

seco quanto comparados ao grupo controle nas diferentes faixas etárias. Apesar do músculo plantar ter apresentado um padrão similar de alteração, de forma que não foram observadas diferenças no peso úmido e na razão peso úmido/peso seco entre os grupos estudados aos três, cinco e sete meses de idade, aos cinco meses de idade, o grupo KO apresentou peso seco maior do que o grupo controle na mesma faixa etária.

Embora essa avaliação seja um parâmetro direto do conteúdo de massa muscular, sua aplicação em músculos cuja massa é muito pequena se torna limitado uma vez que a balança utilizada não tinha sensibilidade adequada para essa quantificação. Dessa forma, para que fosse melhor avaliado o fenótipo muscular desses animais, utilizou-se uma técnica mais sensível, a tipagem de fibras. Essa técnica permitiu a quantificação da área de secção transversa das fibras musculares. De tal modo, que uma melhor avaliação do trofismo muscular nos músculos sóleo e plantar foi realizada (ver FIGURAS 25, 27, 28, 29 e 30).

TABELA 2 - Massa corporal, massa do tecido adiposo retroperitoneal corrigida pela massa corporal, massa do tecido adiposo epididimal corrigida pela massa corporal, medida indireta da massa isenta de gordura e massa gorda em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT			KO		
	3 meses	5 meses	7 meses	3 meses	5	7 meses
Massa corporal (g)	25,9±0,5 (n= 24)	27,8±0,5 (n= 18)	29,6±0,3 (n= 55)	25,0±0,4 (n= 20)	28,7±0,3 (n= 18)	28,1±0,2* (n= 51)
Tecido adiposo retroperitoneal (mg/g)	2,1±0,1 (n= 14)	2,7±0,1 (n= 13)	3,1±0,2 (n= 16)	1,4±0,1* (n= 16)	2,2±0,1* (n= 17)	2,3±0,1* (n= 9)
Tecido adiposo epididimal (mg/g)	10,7±0,5 (n= 13)	11,7±1,2 (n= 6)	10,8±0,8 (n= 19)	10,8±0,2 (n= 15)	10,8±0,8 (n= 8)	9,9±0,5 (n= 9)
Massa isenta de gordura	—	—	0,26±0,011 (n= 9)	—	—	0,31±0,013* (n= 7)
Massa gorda	—	—	0,07±0,008 (n= 9)	—	—	0,03±0,007* (n= 6)

* Diferença significativa vs. WT da mesma faixa etária.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p<0,05$).

TABELA 3 - Peso úmido corrigido pela massa corporal, peso seco corrigido pela massa corporal e razão peso úmido / peso seco dos músculos sóleo e plantar e razão entre peso úmido e seco dos músculos sóleo e plantar em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	Sóleo				Plantar			
	n	Peso úmido (mg /g)	Peso seco (mg /g)	Razão (mg /g)	n	Peso úmido (mg /g)	Peso seco (mg /g)	Razão (mg /g)
WT 3 meses	(8)	0,26±0,002	0,07±0,008	3,4±0,38	(8)	0,50±0,04	0,15±0,01	3,2±0,26
WT 5 meses	(6)	0,22±0,01	0,08±0,004	2,7±0,29	(6)	0,54±0,03	0,16±0,006	3,2±0,15
WT 7 meses	(29)	0,27±0,006	0,08±0,002	3,3±0,10	(26)	0,54±0,01	0,15±0,005	3,5±0,008
KO 3 meses	(13)	0,28±0,02	0,07±0,004	3,7±0,22	(13)	0,57±0,03	0,18±0,008	3,3±0,15
KO 5 meses	(12)	0,26±0,009	0,10±0,004	2,6±0,11	(12)	0,60±0,01	0,21±0,006 *	2,8±0,08
KO 7 meses	(17)	0,24±0,01	0,08±0,006	3,3±0,17	(23)	0,50±0,01	0,15±0,005	3,2±0,09

* Diferença significativa vs. WT 5 meses.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p<0,05$).

5.5 Avaliação da atividade locomotora espontânea de camundongos observados em campo aberto

Para dissociar o efeito deletério da IC sobre o músculo esquelético, das alterações periféricas atribuídas pelo efeito de descondicionamento físico induzido pela síndrome, foi realizado a avaliação comportamental em campo aberto.

Para a avaliação comportamental, foi aplicada uma das formas mais utilizadas para a medida da atividade locomotora de roedores, feita por observação direta dos parâmetros de locomoção em um campo aberto. A avaliação foi realizada nos camundongos controle e KO aos três meses de idade (onde se espera observar somente o efeito da hiperatividade simpática, uma vez que a cardiomiopatia está em estágio inicial) com reavaliação aos sete meses de idade (onde a cardiomiopatia é grave e associada à IC).

Como observado na FIGURA 20A, o grupo KO com três meses de idade apresentou diminuição da atividade locomotora espontânea quando comparado ao grupo controle. Na FIGURA 20B, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos quanto a variável comportamental levantar. Esses resultados sugerem, que aos três meses de idade, camundongos KO podem apresentar comprometimento motor. No entanto, resultados de função (teste de tolerância ao esforço) e estrutura muscular esquelética, demonstraram que nesta mesma faixa etária não havia diferenças significantes entre os grupos estudados (vide itens 5.3 e 5.7). Além disso, na mesma época foram realizados testes comportamentais adicionais, como: Labirinto Elevado em Cruz e *Light ↔ Dark Box Test* (testes que avaliam a ansiedade); Nado Forçado e *Tail Suspension Test* (testes utilizados para avaliar aspectos da motivação, como a Depressão). Após a análise dos resultados obtidos nesses testes, foi constatado que os animais KO apresentavam um quadro de depressão e ansiedade, onde grande parte das alterações comportamentais se manifestavam principalmente no início de cada teste. Como esses animais apresentam depressão, as alterações obtidas no início dos testes poderiam estar mais relacionadas à diminuição da motivação e não necessariamente à capacidade locomotora do animal. De fato, quando foi reavaliada a variável comportamental locomoção (FIGURA 21A) e a variável comportamental levantar (FIGURA 21B)

apenas nos 150 segundos finais do teste, não foram observadas mais as diferenças entre os grupos aos sete meses de idade.

Para confirmar esses resultados, foi realizada a avaliação da variável latência, que corresponde ao tempo que o animal leva para deixar o centro do aparato em direção a periferia ao iniciar o teste (FIGURA 21D). Foi observado que os animais KO apresentavam maior latência quando comparados aos camundongos controle aos três e sete meses de idade (FIGURA 21C). Em uma análise qualitativa foi possível observar que durante o período da latência, os animais KO permaneciam imóveis por mais tempo do que o grupo controle, refletindo então, na redução da atividade locomotora total observada durante o teste, no entanto essa alteração parece estar mais associada a fatores emocionais do que motores.

* Diferença significativa vs. WT da respectiva faixa etária.

FIGURA 20 - Análise comportamental da atividade locomotora espontânea em teste de campo aberto. (A) Avaliação da variável comportamental locomoção e (B) Avaliação da variável comportamental levantar em camundongos controle (WT) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. WT da respectiva faixa etária.

FIGURA 21 - Análise comportamental da atividade locomotora espontânea em teste de campo aberto. (A) Avaliação da variável comportamental locomoção e (B) Avaliação da variável comportamental levantar nos 150 segundos finais em camundongos controle (WT) com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade. (C) Latência dos grupos WT e KO aos três e sete meses de idade. (D) Ilustração da medida da latência. Nas figuras A e B, os dados foram comparados entre os grupos pelo *Teste t de Student* para dados não pareados. Na figura C, os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.6 Avaliação da Caracterização Bioquímica do Músculo Esquelético

Alterações metabólicas no músculo esquelético em decorrência da IC já vêm sendo descritas como um dos marcadores desta síndrome. Mediante isso, como parte deste estudo, foi realizada a caracterização bioquímica por meio da avaliação da atividade máxima da enzima hexoquinase, como representante do metabolismo anaeróbio, e pela atividade máxima da enzima citrato sintase, representante da via oxidativa. Essas medidas foram realizadas nas faixas etárias de três e sete meses de idade.

5.6.1 Atividade máxima da enzima hexoquinase.

Nos grupos controle e KO, aos três e sete meses de idade, foi realizada a avaliação da atividade máxima da enzima hexoquinase nos músculos sóleo (FIGURA 22A), na porção vermelha do músculo gastrocnêmio (FIGURA 22B) e na porção branca do músculo gastrocnêmio (FIGURA 22C).

No músculo sóleo, aos três meses de idade, não foi observada alteração da atividade máxima da enzima hexoquinase entre os grupo estudados (FIGURA 22A). O mesmo foi constatado aos sete meses de idade. No entanto, quando comparado o grupo KO aos três meses de idade com o grupo KO aos sete meses de idade, observou-se que este último apresentou diminuição da atividade máxima da enzima hexoquinase.

Na porção vermelha do músculo gastrocnêmio, os resultados foram similares aos encontrados no músculo sóleo. Aos três meses de idade, não se observou alteração na atividade máxima da enzima hexoquinase entre os grupos estudados (FIGURA 22B). Aos sete meses de idade, quando realizada a comparação entre os grupos KO, três e sete meses de idade, embora apresentasse uma tendência para diminuição da atividade ($p = 0,07$), essa diferença não foi significativa.

Na porção branca do músculo gastrocnêmio, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos estudados (FIGURA 22C).

Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 22 - Avaliação da atividade máxima da enzima hexoquinase em camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Músculo sóleo. (B) Porção vermelha do músculo gastrocnêmio. (C) Porção branca do músculo gastrocnêmio. Os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.6.2 Atividade máxima da enzima citrato sintase.

Foi realizada a avaliação da atividade máxima da enzima citrato sintase nos músculos sóleo (FIGURA 23A), na porção vermelha do músculo gastrocnêmio (FIGURA 23B) e na porção branca do músculo gastrocnêmio (FIGURA 23C) em camundongos controle e KO aos três e sete meses de idade.

No músculo sóleo, aos três meses de idade, não foi observado alteração na atividade da enzima citrato sintase entre os grupos estudados. No entanto, aos sete meses de idade o grupo KO apresentou redução na atividade enzimática quando comparado ao controle da mesma idade (FIGURA 23A). Além do grupo KO diferir do grupo controle na idade de sete meses, também diferiu do grupo KO aos três meses de idade.

Na porção vermelha do músculo gastrocnêmio, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos estudados (FIGURA 23B).

Na porção branca do músculo gastrocnêmio foi observada alteração entre os grupos estudados somente aos três meses de idade. Nesta faixa etária o grupo KO apresentou aumento na atividade máxima da enzima citrato sintase quando comparado ao grupo controle (FIGURA 23C).

* Diferença significativa vs. grupo WT.

Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 23 - Avaliação da atividade máxima da enzima citrato sintase em camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Músculo sóleo. (B) Porção vermelha do músculo gastrocnêmio. (C) Porção branca do músculo gastrocnêmio. Os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.7 Determinação dos Tipos de Fibras Musculares e Medida da Área de Secção Transversa

5.7.1 Músculo sóleo

Por meio da técnica de histoquímica para miosina ATPase, foi avaliada tanto a distribuição, quando a área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras do músculo sóleo de camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade. Na FIGURA 24, pode-se observar que aos três meses de idade nenhum tipo de fibra muscular (Tipo I, intermediária e Tipo IIA) estava alterado entre os grupos estudados, entretanto, aos cinco meses de idade observou-se redução das fibras intermediárias (FIGURA 24B), com aumento das fibras do tipo IIA (FIGURA 24C) no grupo KO quando comparado ao controle da mesma faixa etária. Nessa mesma idade observou-se também, aumento das fibras intermediárias no grupo controle em relação ao controle com três meses de idade. Aos sete meses de idade, além do aumento das fibras do tipo IIA, constatou-se também a diminuição na porcentagem de fibras do tipo I no grupo KO (FIGURA 24A).

Quanto à avaliação da área de secção transversa, pode-se observar que apenas aos sete meses de idade foram constatadas diferenças entre os camundongos controle e KO. Nesta faixa etária, o grupo KO apresentou redução de 17,8% na área de secção transversa das fibras tipo I em relação ao grupo controle (FIGURA 25A). Na fibra intermediária (FIGURA 25B) e tipo IIA (FIGURA 25C) essa redução foi ainda maior (24,4% e 27,6%, respectivamente). Esses resultados corroboram os dados da literatura, pois, o tipo de fibra que mais sofre alteração no trofismo, é o tipo II.

* Diferença significativa vs. grupo WT.

@ Diferença significativa vs. WT.3 meses.

FIGURA 24 - Determinação do tipo de fibra no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e KO aos três, cinco e sete meses de idade. (A) % de fibras do tipo I, (B) % de fibras Intermediárias e (C) % de fibras do tipo IIA. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. WT 7 meses.

Diferença significativa vs. KO 5 meses.

FIGURA 25 - Área de secção transversa por tipo de fibra no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e KO aos três, cinco e sete meses de idade. (A) Fibras do tipo I, (B) Fibras Intermediárias e (C) Fibras do tipo IIa. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.7.2 Músculo plantar

Diferente do que foi observado no músculo sóleo, a distribuição de fibras no músculo plantar apresentou um padrão diferenciado. Aos três meses, camundongos KO apresentaram diminuição da porcentagem de fibras do tipo IIA (FIGURA 26A), aumento na porcentagem de fibras intermediárias (FIGURA 26B) e fibras do tipo IIB (FIGURA 26C). Essa diferença não foi mantida aos sete meses de idade. Os resultados referentes à idade cinco meses dos grupos controle e KO não serão apresentados, pois, devido a problemas na realização da histoquímica para a miosina ATPase, a coloração ficou muito clara dificultando uma análise criteriosa para a identificação dos subtipos de fibra. No entanto, foi possível a realização da área de secção transversa do músculo plantar, visto que para a realização dessa medida é necessário apenas identificar a delimitação do músculo.

Além da distribuição de fibras, aos três meses de idade, o grupo KO quando comparado ao controle apresentou aumento na área de secção transversa de 29,3% nas fibras do tipo IIA (FIGURA 27 e 28A), aumento de 25,7% nas fibras intermediárias (FIGURA 28B) e aumento de 22% nas fibras do tipo IIB (FIGURA 27 e 28C), além do aumento de 15% na área de secção transversa do músculo plantar (FIGURA 29). Esse aumento apresentado pelo grupo KO sofreu uma diminuição ao longo dos meses entre os grupos KO, apresentando diferença significativa nas fibras do tipo IIA, fibras intermediárias e fibras do tipo IIB (KO três meses vs. KO sete meses). Aos sete meses de idade, os animais KO não apenas diferem do grupo KO com três meses, mas também apresentam atrofia (13%) das fibras do tipo IIB quando comparados ao grupo controle (FIGURA 28C). O mesmo padrão na evolução da atrofia muscular ao longo dos meses nos camundongos KO foi observado na avaliação da área de secção transversa do músculo plantar, de forma que o grupo KO com sete meses apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos KO três meses e KO cinco meses de idade. Embora a diferença não seja significativa ($p= 0,06$), os camundongos KO apresentaram uma menor área no músculo plantar em relação ao grupo controle aos sete meses de idade (FIGURA 29A). Entretanto, quando a área de secção transversa do músculo plantar foi

normalizada pela massa corporal, observou-se uma potencialização das diferenças entre os grupos estudados (FIGURA 30).

* Diferença significativa vs. WT 3 meses.

Diferença significativa vs. KO.3 meses.

FIGURA 26 - Determinação do tipo de fibra no músculo plantar de camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) % de fibras do tipo II, (B) % de fibras Intermediárias e (C) % de fibras do tipo IIB. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

FIGURA 27 - Imagens do diâmetro de fibras do músculo plantar obtidos pela reação histoquímica para miosina ATPase em pH 10,3 de camundongos controle (WT) e KO. Os asteriscos vermelhos indicam as fibras do tipo IIA e os asteriscos amarelos, as fibras do tipo IIB. (A) Animal WT aos três meses de idade. (B) Animal KO aos três meses de idade. (C) Animal KO aos sete meses de idade.

* Diferença significativa vs. grupos WT.

Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 28 - Área de secção transversa por tipo de fibra no músculo plantar de camundongos controle (WT) e KO aos três e sete meses de idade. (A) Fibras do tipo IIA, (B) Fibras Intermediárias e (C) Fibras do tipo IIB. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. WT 3meses.

Diferença significativa vs. KO 3 meses e KO 5 meses.

FIGURA 29 - Área de secção transversa do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade (A). Imagem do músculo plantar de um animal WT aos três meses de idade representada pela linha pontilhada vermelha (B) e do músculo plantar de um animal KO aos três meses de idade (C). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. WT 3meses.

Diferença significativa vs. KO 3 meses.

FIGURA 30 - Área de secção transversa do músculo plantar normalizada pela massa corporal de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

5.8 Avaliação da Capilarização Muscular

Para saber se no modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática haveria algum comprometimento extrínseco à musculatura esquelética que pudesse contribuir para as alterações musculares intrínsecas observadas até então, foi avaliada a capilarização em diferentes músculos nos grupos controle e KO ao longo dos meses.

5.8.1 Músculo sóleo

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados quando foi realizada a relação capilar por tipo de fibra (fibra tipo I e fibra tipo IIA, respectivamente, FIGURA 31A e 31B). No entanto, quando avaliou-se a capilarização por fibras sem fazer estratificações por tipo de fibra, aos sete meses de idade, camundongos KO apresentaram rarefação capilar quando comparados ao grupo controle. Essa resposta sugere que a rarefação vascular ocorre no músculo como um todo, não estando limitada a um determinado tipo de fibra.

5.8.2 Músculo plantar

No músculo plantar (FIGURA 32) não foram observadas diferenças significantes tanto na razão capilar por tipo de fibra (fibra tipo IIA e fibra tipo IIB), quanto na razão capilar por fibras, embora, nesta última análise foi observada uma tendência ($p= 0,056$) em diminuição no grupo KO aos três meses de idade (FIGURA 32C).

5.8.3 Porção branca do músculo gastrocnêmio

Na FIGURA 33, que ilustra um músculo misto, o gastrocnêmio que é composto em sua porção branca principalmente por fibras do tipo IIA, constatou-se rarefação capilar tanto aos três, quanto aos sete meses de idade no grupo KO quando comparado aos camundongos controle da mesma faixa etária.

* Diferença significativa vs. WT 7 meses.

FIGURA 31 - Avaliação da capilarização do músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade. (A) Razão capilar por fibra do tipo I. (B) Razão capilar por fibra do tipo IIA. (C) Razão capilar por fibra. Os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

FIGURA 32 - Avaliação da capilarização do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. (A) Razão capilar por fibra do tipo IIA. (B) Razão capilar por fibra do tipo IIB. (C) Razão capilar por fibra. Os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

* Diferença significativa vs. grupo WT.

FIGURA 33 - Avaliação da razão capilar por fibra da porção branca do músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade. Os dados foram comparados pela análise de variância de dois fatores (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo de caracterização bioquímica, estrutural e funcional do músculo esquelético em modelo genético de hiperatividade do sistema nervoso simpático. Sua aplicabilidade em futuros estudos envolvendo diferentes estratégias no tratamento da insuficiência cardíaca será fundamental uma vez que o conjunto dessas alterações, intrínsecas e extrínsecas, da musculatura esquelética contribui ainda mais para o mau prognóstico da síndrome.

De acordo com a hipótese inicial, os camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos apresentaram alterações músculo-esqueléticas acompanhadas de intolerância ao esforço na fase em que a cardiomiopatia era grave e associada a sinais de IC. Estes resultados sugerem que esse é um bom modelo

para o estudo das alterações periféricas decorrentes da IC, além de dispor uma ótima ferramenta para o entendimento do efeito da hiperatividade simpática no músculo esquelético e dos possíveis mecanismos envolvidos na regulação do trofismo muscular.

Caracterização da insuficiência cardíaca nos camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos

Para confirmar os achados de BRUM et al. (2002) (BRUM et al., 2002), quanto ao desenvolvimento da cardiomiopatia nos camundongos com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos, foi parte deste estudo à realização de avaliações hemodinâmicas, ecocardiográficas e da concentração de noradrenalina circulante, bem como a avaliação da tolerância ao esforço físico, medida comumente utilizada na prática clínica como uma das formas de classificação da IC.

Parâmetros hemodinâmicos

Quando avaliada a pressão arterial dos camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos nas diferentes idades pelo método indireto de pletismografia de cauda, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e KO. De acordo com as respostas vasomotoras desencadeadas pela hiperatividade nervosa simpática, era esperado que os animais KO apresentassem aumento da pressão arterial, uma vez que a noradrenalina quando ligada aos receptores α -adrenérgicos presentes nos vasos promove vasoconstrição, aumento da resistência vascular periférica e conseqüentemente da pressão arterial (BLANKESTIJN, 2004). Entretanto os camundongos KO apresentaram níveis pressóricos normais ao longo do período de estudo. A possível explicação para a inalteração da pressão arterial nesses camundongos KO, considerando que a pressão arterial é uma variável hemodinâmica dependente do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, é que provavelmente o grupo KO apresente aumento da resistência vascular periférica devido a hiperatividade nervosa simpática, mas a possível queda do débito cardíaco como reflexo da disfunção ventricular observada

nesse modelo, possivelmente proporcionou um contrabalanço com a resistência vascular periférica aumentada, que resultou na não alteração da pressão arterial desses animais. É importante ressaltar que os camundongos KO não desenvolvem hipertensão arterial mesmo na presença de hiperatividade nervosa simpática, o que já foi anteriormente demonstrado para esses animais (BRUM et al., 2002). Entretanto, quando submetidos a uma sessão de exercício físico, os camundongos KO apresentam pressão arterial maior que o grupo controle, demonstrando que esses animais são hiperreativos a esse tipo de estímulo (dados não publicados). Outra importante consideração, é que esse comportamento da pressão arterial é comumente observado em pacientes portadores de IC, visto que da mesma forma, o aumento da resistência vascular periférica pela ativação simpática é acompanhado pelo baixo débito cardíaco, proporcionando níveis pressóricos normais nesses indivíduos (NEGRAO, HAMILTON, FONAROW, HAGE, MORIGUCHI & MIDDLEKAUFF, 2000; SANTOS, ALVES, RONDON, BARRETTO, MIDDLEKAUFF & NEGRAO, 2005).

A frequência cardíaca dos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade foi avaliada pelo intervalo de pulso de pressão arterial obtida pelo método indireto de pletismografia de cauda. Conforme apresentado nos resultados, os camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos apresentaram frequência cardíaca elevada aos três, cinco e sete meses de idade. Essa taquicardia é característica neste modelo de cardiomiopatia por hiperatividade do sistema nervoso simpático, uma vez que existe uma hiper-estimulação dos receptores β_1 - adrenérgicos cardíacos. Esses dados corroboram os dados de BRUM et al. (2002) (BRUM et al., 2002), no qual animais KO apresentaram taquicardia de repouso aos quatro meses de idade quando comparados ao grupo controle.

É interessante notar, que a frequência cardíaca apresentou aumento gradual ao longo dos meses, sendo de maior magnitude nos camundongos KO aos sete meses de idade, o que pareceu estar associado com a progressão da cardiomiopatia. Esse aumento da frequência cardíaca associado à progressão da cardiomiopatia também foi acompanhado pelo aumento das concentrações plasmáticas de noradrenalina. O que de fato já era esperado, uma vez que esses

resultados já foram demonstrados por (HEIN, ALTMAN & KOBILKA, 1999). Os resultados encontrados foram muito semelhantes aos dados de frequência cardíaca, de forma que os animais KO apresentaram aumento gradual das concentrações plasmáticas de noradrenalina aos cinco e sete meses de idade quando comparados ao grupo controle. Porém aos três meses de idade, embora o grupo KO apresentasse maior concentração de noradrenalina plasmática essa diferença não foi significativa. Entretanto, experimentos realizados no laboratório demonstraram que os camundongos KO apresentam tônus simpático cardíaco aumentado aos três, cinco e sete meses de idade. Sendo assim, com base nesses dados somados à taquicardia basal apresentada pelos animais KO nas diferentes faixas etárias, pode-se sugerir que os camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos apresentam hiperatividade nervosa simpática ao longo dos meses, corroborando os dados de Hein e colaboradores.

Avaliação ecocardiográfica

Atualmente, a utilização do exame ecocardiográfico na avaliação morfofuncional cardíaca é extremamente recomendada para fins de prognóstico e como indicadores de progressão da IC (FRIGERIO & ROUBINA, 2005). A fração de encurtamento, a fração de ejeção e o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, fazem parte do repertório de medidas mais utilizadas no diagnóstico da IC em humanos (DE SIMONE & PALMIERI, 2002; WANG, YIP, WANG, ZHANG, HO, TSE, YU & SANDERSON, 2005). Além disso, esses parâmetros também são utilizados na detecção de alterações morfofuncionais cardíacas de camundongos (NIENABER et al., 2003; SANTOS et al., 2006).

É consenso na literatura que a atividade nervosa simpática, quando ativada cronicamente, acarreta em remodelamento cardíaco acompanhado pela disfunção ventricular esquerda (BRUM, ROLIM, BACURAU & MEDEIROS, 2006). Dessa forma, para avaliar as alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes da hiperatividade nervosa simpática nos camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos foi realizado ecocardiograma aos três, cinco e sete meses de idade.

Conforme observado nos resultados, aos três meses de idade os camundongos KO apresentaram ligeira diminuição da função sistólica, caracterizada pela diminuição da fração de encurtamento e fração de ejeção. Aos cinco meses de idade, essa disfunção sistólica agravou-se ainda mais e se manteve igual até os sete meses de idade. Nesta idade, além da disfunção ventricular grave, também foi constatada uma dilatação do ventrículo esquerdo. Esses resultados sugerem que os camundongos KO apresentam uma progressão da disfunção ventricular ao longo do tempo. Portanto, foi possível constatar que aos sete meses de idade os animais KO apresentam sinais clínicos de IC como a dilatação ventricular esquerda acompanhada de disfunção contrátil. Por sua vez, as análises ecocardiográficas realizadas nesse estudo tiveram como limitação a impossibilidade da avaliação da função diastólica dos camundongos controle e KO, uma vez que a elevada frequência cardíaca apresentada pelos camundongos, mesmo sob efeito da anestesia, promoveu a sobreposição das ondas E (enchimento rápido do ventrículo) e A (enchimento lento do ventrículo); e a medida do tempo de relaxamento isovolumétrico não foi sensível o suficiente para detectar diferença entre os grupos estudados. Entretanto, por meio da cateterização intraventricular, uma medida direta, foi possível observar que camundongos KO apresentam déficit lusitrópico aos sete meses de idade, deste modo, caracterizando uma disfunção diastólica (BRUM et al., 2002).

Outro sinal clínico importante para a determinação do quadro de IC em camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos aos sete meses de idade, é a formação de edema pulmonar. FERREIRA et al. (2006) (FERREIRA et al., 2006), observaram aumento no teor de água nos pulmões por meio do cálculo da razão peso úmido/peso seco dos pulmões. O grupo KO apresentou 65% de aumento na razão quando comparado ao grupo controle. A formação de edema pulmonar é um sinal clássico de IC tanto em humanos quanto em modelos experimentais (NISHI, KAWANO, MISAKI, HOSHI, MASUMI, IIDA, WATANABE & YAMAGUCHI, 2006; REMO, 2005), pois reflete a incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear sangue devido ao prejuízo da função contrátil cardíaca (FIGUEROA & PETERS, 2006). Como consequência, o que se observa é um aumento do volume sistólico final,

regurgitação de sangue para o átrio esquerdo e, conseqüentemente, acúmulo de líquido nos pulmões.

Tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico pode ser definida como a quantidade máxima de exercício físico realizado num teste progressivo até a exaustão. A capacidade de realização de exercício físico pode ser quantificada por parâmetros obtidos no teste progressivo até a exaustão como a velocidade final atingida no teste ou a distância total percorrida no teste (BERNSTEIN, 2003). No presente estudo, os camundongos nas faixas etárias de três, cinco e sete meses de idade foram submetidos ao protocolo de teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante com o objetivo de avaliar a tolerância à realização de esforço físico.

Conforme observado nos resultados apresentados, o grupo KO aos sete meses de idade apresentou diminuição da distância total percorrida e da velocidade final atingida durante o teste progressivo até a exaustão, sugerindo que nesta faixa etária os animais KO apresentam intolerância à realização de esforço físico. Este resultado foi reproduzido em todos os estudos que realizaram esta avaliação no laboratório.

Essa avaliação foi importante, pois um dos marcadores da IC é a intolerância à realização de esforço, que é definida como redução na capacidade de realizar exercício físico dinâmico devido a sintomas como dispnéia ou fadiga periférica (RUBIM, DRUMOND NETO, ROMEO & MONTERA, 2006). Dessa forma, o teste de esforço é comumente utilizado para diagnóstico ou prognóstico de doenças cardíacas, já que algumas anormalidades cardíacas são aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Entretanto, a relação entre intolerância ao esforço e a síndrome da IC, está longe de ser apenas uma conseqüência da disfunção cardíaca, pois foi demonstrado que a correlação entre o nível de prejuízo nas variáveis cardíacas e o grau de tal intolerância é baixo (FRANCIOSA, PARK & LEVINE, 1981). A partir desses achados, mudanças intrínsecas à musculatura esquelética começaram a serem investigadas, e foi

demonstrado que há uma alta correlação entre o nível de intolerância aos esforços físicos e o grau de prejuízo funcional da musculatura esquelética (HARRINGTON et al., 1997; MINOTTI, CHRISTOPH, OKA, WEINER, WELLS & MASSIE, 1991; VOLTERRANI, CLARK, LUDMAN, SWAN, ADAMOPOULOS, PIEPOLI & COATS, 1994). Além disso, JONDEAU et al. (1992) (JONDEAU, KATZ, ZOHMAN, GOLDBERGER, MCCARTHY, BOURDARIAS & LEJEMTEL, 1992) foi realizado um estudo bastante relevante, demonstrando que a diminuição da capacidade física em pacientes portadores de IC grave não ocorre devido a uma menor reserva cardiopulmonar. Neste estudo os autores constataram que a frequência cardíaca e o consumo de oxigênio aumentavam na maioria dos pacientes que adicionavam exercício para membros superiores após o consumo de oxigênio ter atingido pico durante exercício físico em bicicleta, demonstrando que os danos periféricos, e não a redução no débito cardíaco, limitavam a maioria dos pacientes com IC.

Dentre as alterações intrínsecas à musculatura esquelética observadas na IC, as proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} também vêm sendo apontadas como um dos fatores causais do desenvolvimento da intolerância ao esforço físico (PETERS, MITCHELL-FELTON & KANDARIAN, 1999; SIMONINI et al., 1996). Essa idéia surgiu quando foi observado que a diminuição da produção de força máxima de pacientes com IC persistia mesmo quando essa variável era normalizada pela área de secção transversa do músculo (PERREAULT, GONZALEZ-SERRATOS, LITWIN, SUN, FRANZINI-ARMSTRONG & MORGAN, 1993). Além disso, a atrofia muscular, a mudança do tipo de fibra e a menor prevalência do metabolismo aeróbio, embora importantes para o quadro de intolerância ao esforço, não explicam por completo o padrão de fadiga muscular observado nesses pacientes, o que parece estar associado ao prejuízo no acoplamento excitação-contração e conseqüentemente, ao íon Ca^{2+} (LUNDE et al., 2006; LUNDE et al., 2001a). Recentemente, foi realizado um estudo do envolvimento dessas proteínas nos músculos plantar e sóleo de camundongos KO (BUENO JUNIOR, BACURAU, JARDIM & BRUM, 2006). Na fase em que é observada a intolerância ao esforço, aos sete meses de idade, o grupo KO apresentou diminuição na expressão da proteína sarco-endo retículo Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) tanto no músculo plantar, quanto no músculo sóleo, sendo essa proteína a

principal bomba de Ca^{2+} responsável pela recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático após a contração na musculatura esquelética (BERCHTOLD, BRINKMEIER & MUNTENER, 2000; PETERS, MITCHELL, MCCUNE, PARK, WILLIAMS & KANDARIAN, 1997). Assim como em relação à SERCA2, a expressão do trocador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX) foi menor nos animais KO em relação aos animais controle no músculo plantar e apresentou tendência de queda ($p= 0,08$) no músculo sóleo aos sete meses de idade. Partindo da ação fisiológica dessas proteínas, pode-se sugerir que esse prejuízo na expressão protéica parece levar a um prejuízo contrátil na musculatura esquelética, como um relaxamento muscular inadequado e uma menor geração de tensão, dessa forma, contribuindo para o quadro de intolerância ao esforço físico apresentado pelos animais KO.

Portanto, de acordo com o exposto acima, pode-se atribuir ao teste de tolerância ao esforço, a capacidade de avaliar a funcionalidade da musculatura esquelética na IC, uma vez que parte da resposta de intolerância ao esforço físico obtida no teste é principalmente devido a alterações intrínsecas à musculatura esquelética e não ao comprometimento cardíaco. Além disso, nesse modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática apesar de apresentar disfunção ventricular nas faixas etárias de três e cinco meses, somente aos sete meses de idade, fase em que foi observada a intolerância ao esforço, foram constatadas alteração nas proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} , aumento na porcentagem de fibras do tipo II e a atrofia muscular, o que reforçam ainda mais a relação entre a intolerância ao esforço e a miopatia muscular esquelética observadas nesses animais. No entanto, uma avaliação funcional direta na fibra muscular, mensurando parâmetros como tensão máxima desenvolvida após um estímulo ou tempo de relaxamento após a contração, seria fundamental para a realização deste projeto. Infelizmente são poucos os laboratórios que desenvolvem essa técnica no Brasil, o que inviabilizou a realização desse experimento até o momento.

Diante dessa limitação, para um melhor entendimento da função muscular, avaliou-se o lactato sanguíneo, uma vez que seu comportamento durante o exercício físico está relacionado diretamente a função contrátil do músculo esquelético (WELTMAN, 1995). Além disso, é conhecido que a menor capacidade de realizar

exercício físico observada em pacientes portadores de IC, é caracterizada pelo acionamento precoce do metabolismo anaeróbio (acúmulo de lactato) para uma dada intensidade de esforço (BARLOW, QAYYUM, DAVEY, CONWAY, PATERSON & ROBBINS, 1994; VESCOVO, 2002).

Para verificar se a intolerância à realização de esforço, observada nos camundongos KO aos sete meses de idade, estava associada à antecipação da fadiga periférica pelo acúmulo de lactato nos camundongos KO foram realizados testes de exercício prolongado com cargas independentes para a determinação da máxima fase estável do lactato sanguíneo (MFEL) em camundongos controle e KO. No início do exercício físico com intensificação progressiva, existe elevação da concentração de lactato até que o metabolismo aeróbio tenha condições de suprir as necessidades energéticas do exercício. No entanto, em exercício moderado, a concentração de lactato se estabiliza, sugerindo equilíbrio entre sua produção e remoção (máxima fase estável de lactato). Nesse momento, ainda existe o predomínio do metabolismo aeróbio sobre o anaeróbio. Após essa fase, a participação anaeróbia glicolítica torna-se necessária e a produção de lactato se intensifica, com acúmulo em forma exponencial.

Aos três e cinco meses de idade não houve diferença significativa na velocidade da MFEL entre os grupos controle e KO, entretanto, aos sete meses de idade, os animais KO alcançaram a MFEL em velocidade inferior quando comparado aos animais controle. Logo, os dados sugerem que os camundongos KO apresentam intolerância ao esforço associado à antecipação do metabolismo anaeróbio.

De fato, é conhecido que na IC o predomínio do metabolismo anaeróbio ocorre mais precocemente que em indivíduos saudáveis (BULLER, JONES & POOLE-WILSON, 1991; HARRIDGE, MAGNUSSON & GORDON, 1996). Ao contrário do que se acreditava, o menor débito cardíaco e conseqüentemente a menor perfusão da musculatura esquelética não estão envolvidos diretamente na antecipação da fadiga, uma vez que esta é observada mesmo em situações em que a oxigenação é adequada (BULLER, JONES & POOLE-WILSON, 1991; MANCINI, WILSON, BOLINGER, LI, KENDRICK, CHANCE & LEIGH, 1994; WILSON, MANCINI & DUNKMAN, 1993). Contudo, numerosos estudos utilizando avaliações bioquímicas

e a técnica de ressonância magnética espectroscópica de ^{31}P identificaram significantes alterações nos músculos de pacientes portadores de IC, como redução da capacidade mitocondrial e do consumo de ácidos graxos, aumento da capacidade glicolítica, diminuição nos estoques de creatina fosfato e em sua ressíntese, além da diminuição do pH intramuscular (KATZ, BLEIBERG, WEXLER, BHARGAVA, STEINBERG & LEJEMTEL, 1993; POOLE-WILSON & FERRARI, 1996; SULLIVAN, GREEN & COBB, 1990; WILSON, MANCINI & DUNKMAN, 1993). Por conseguinte, passou-se a acreditar que não a indisponibilidade de oxigênio, e sim a limitação em sua utilização podem acarretar nessa disfunção metabólica e conseqüentemente no acionamento precoce da fadiga muscular, que é um dos maiores sintomas reportados por pacientes dessa síndrome (STASSIJNS, LYSSENS & DECRAMER, 1996).

No entanto, uma importante questão vêm sendo discutida na literatura. Serão todas essas alterações musculares decorrentes da IC, ou também podem ocorrer devido a outras condições? É conhecido que a inatividade física ou o descondicionamento físico acarretam em alterações tanto metabólicas como morfológicas na musculatura esquelética semelhante às observadas na IC (BOOTH & GOLLNICK, 1983; PIEPOLI et al., 2001; THOMASON & BOOTH, 1990), uma vez que, pacientes portadores de IC freqüentemente se tornam mais sedentários (SCHULZE et al., 2002; SIMONINI et al., 1996). Com o intuito de dissociar as possíveis alterações fenotípicas do músculo esquelético nesse modelo de cardiomiopatia com as da inatividade física, se fez necessária avaliação comportamental da atividade locomotora espontânea.

Como apresentado na seção de resultados, foi observado que o grupo KO apresentou menor atividade locomotora espontânea quando comparado ao grupo controle nas faixas etárias de três e sete meses de idade. Além disso, aos sete meses de idade, o grupo KO apresentou diminuição significativa da variável comportamental levantar, que também é considerado como um indicativo de locomoção. Apesar dos resultados sugerirem que esses animais possuem comprometimento motor já aos três meses de idade, os resultados de capacidade funcional (teste de tolerância ao esforço e avaliação da MFEL) e avaliação morfológica do músculo esquelético não apresentaram alterações nesta mesma faixa

etária, de forma que a realização de outros testes comportamentais auxiliou na interpretação dos resultados obtidos em questão. Logo, foi constatado que a diminuição da atividade locomotora espontânea no grupo KO era devido a alterações cognitivas (redução na motivação) e não alterações periféricas (intrínsecas do músculo esquelético). De fato, SCHRAMM et al. (2001) (SCHRAMM, MCDONALD & LIMBIRD, 2001) demonstraram que animais com deleção dos receptores α_{2A} adrenérgico possuíam fenótipo comportamental de depressão e ansiedade, resultados semelhante aos encontrados no presente estudo em camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos. Dessa forma, no teste da atividade locomotora espontânea em campo aberto, os resultados obtidos da atividade locomotora estavam associados à motivação não necessariamente à capacidade locomotora do animal, como foi observado aos três meses de idade.

Até o momento, com base nos dados da descrição fenotípica dos camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos realizados neste estudo, e com base nos resultados obtidos pelo laboratório, pode-se sugerir que esses animais apresentam aos três, cinco e sete meses de idade cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática em estágios inicial, moderado e avançado, respectivamente. Na faixa etária de sete meses, é observado que os camundongos KO apresentam intolerância ao esforço físico associado ao acionamento precoce do metabolismo anaeróbio, agravamento da disfunção sistólica, aumento da retenção hídrica nos pulmões, hipertrofia dos cardiomiócitos, acúmulo de colágeno cardíaco e elevada concentração de noradrenalina circulante. Vale a pena ressaltar que nesta fase os animais KO apresentam 50% de mortalidade (BRUM et al., 2002), podendo portanto, caracterizar esta fase como o agravamento da disfunção cardíaca com sinais clínicos de IC nesses animais.

Avaliação da Composição Corporal

Com intuito de avaliar a composição corporal, foram utilizados parâmetros diretos e indiretos nos grupos KO e controle aos três, cinco e sete meses de idade.

A massa corporal é um parâmetro indireto comumente utilizado em pesquisa experimental, e quando associada a outros parâmetros da avaliação da composição corporal pode ser um indicativo no diagnóstico do quadro de caquexia. Dessa forma, foi realizado o controle ponderal dos camundongos controle e KO aos três, cinco e sete meses de idade no início dos protocolos experimentais e no dia do sacrifício, sendo apresentado neste projeto somente os valores da massa corporal referentes ao dia do sacrifício. Como apresentado na sessão de resultados, o grupo KO apresentou perda de massa corpórea quando comparado ao grupo controle aos sete meses de idade. O mesmo não foi observado nas demais faixas etárias.

A menor massa corporal observada nos camundongos KO aos sete meses de idade parece estar relacionada com a redução da massa gorda observada nestes animais, uma vez, que foram realizadas as pesagens dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal nos grupos estudados. No grupo KO foi observada redução do tecido adiposo retroperitoneal aos três, cinco e sete meses de idade quando comparado ao grupo controle, no entanto, mesmo havendo redução do tecido adiposo epididimal a partir dos quinto mês de idade no grupo KO, essa redução não foi significativa. Embora a avaliação indireta da composição corporal por DEXA não tenha sido realizada nas idades de três e cinco meses em função de problemas com o equipamento, aos sete meses de idade, similar ao observado na gordura retroperitoneal, os animais KO apresentaram redução da massa gorda na região posterior quando comparados ao grupo controle.

Essa redução da gordura corporal pode estar relacionada a diferentes fatores. Recentemente foi realizado um estudo em que foi quantificada a ingestão alimentar dos camundongos KO em diferentes faixas etárias. Aos sete meses de idade, observou-se que o grupo KO apresentava menor consumo de água e ração quando comparado ao grupo controle (BUENO JUNIOR et al., 2006), podendo ser esse um colaborador da redução da massa gorda e por sua vez, na massa corporal. Outro fator importante para a contribuição da redução de gordura corpórea, é a hiperatividade simpática presente nesse modelo. Como descrito anteriormente, aos sete meses de idade é observada alta concentração de noradrenalina plasmática. Dessa forma, uma vez que o tecido adiposo apresenta alta densidade de receptores

β -adrenérgicos, quando ativados resultam numa atividade lipolítica aumentada (BOWERS, GETTYS, PRPIC, HARRIS & BARTNESS, 2005).

Mesmo sendo incontestável a redução da massa gorda no grupo KO, embora não significativa no tecido epididimal, essa não seria a melhor explicação para a redução da massa corporal uma vez que a gordura retroperitoneal foi menor no grupo KO em todas as faixas etárias estudadas, e não apenas aos sete meses de idade. Na tentativa de compreender a menor massa corporal observada nesses animais, foi estudado outro aspecto importante na avaliação da composição corporal, a determinação do peso úmido, peso seco e da razão peso úmido/seco dos músculos sóleo e plantar. No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupo estudados. Embora essa avaliação seja usada como um indicativo de atrofia muscular, a sensibilidade do método não foi adequada para detectar alterações sutis em tecidos em que a massa é muito pequena, como os que foram avaliados (sóleo ~ 7 mg e plantar ~ 14 mg). Para isso seria necessária a utilização de balanças mais precisas. Dessa forma, para melhor avaliar o fenótipo muscular desses animais, foi utilizada uma técnica mais sensível, a tipagem de fibras, que permitiu uma melhor avaliação da massa muscular por meio da determinação da área de secção transversa de cada fibra nos seus diferentes subtipos (esses resultados serão discutidos adiante). Interessante notar, que somente aos sete meses de idade foi observada atrofia muscular no grupo KO, podendo ser esse associado à redução na massa gorda, fator determinante para o estabelecimento da menor massa corporal observada nesta faixa etária.

Dentre as alterações observadas na IC, o agravamento da disfunção morfo-funcional da musculatura esquelética e sua progressão para atrofia muscular, concomitante à redução da massa gorda, redução de apetite, aumento de fatores neurohumorais, podem conduzir pacientes portadores de IC para o quadro de caquexia cardíaca (KOTLER, 2000; MORLEY, THOMAS & WILSON, 2006; ROUBENOFF, HEYMSFIELD, KEHAYIAS, CANNON & ROSENBERG, 1997), condição que contribui para o aumento na taxa de mortalidade nesta síndrome (ANKER et al., 1997).

MOORE et al. (1963) (MOORE, OLESEN, MCMURRAY, PARKER, BALL & BOYDEN, 1963) demonstraram que indivíduos com caquexia apresentaram semelhante perda de massa gorda e massa isenta de gordura, entretanto, o mesmo volume de líquido extracelular foi mantido. Resultados de estudos clínicos em diferentes doenças corroboram esses achados, entre eles, um estudo com indivíduos portadores de IC mostrou que a perda de massa corporal é comum, mas nem sempre consensual (TOTH, GOTTLIEB, GORAN, FISHER & POEHLMAN, 1997). De fato, essa condição nem sempre é observada, pois em alguns casos esse aumento do fluido extracelular, não apenas mascara a diminuição da massa muscular, como também pode aumentar a massa corporal (FREEMAN & ROUBENOFF, 1994). Interessantemente, quando avaliada a massa isenta de gordura no corpo posterior pelo DEXA, foi observado que o grupo KO apresentava um aumento nesta variável quando comparado ao grupo controle.

Com base nesses achados, os resultados apresentados indicam que aos sete meses de idade camundongos KO podem apresentar o quadro de caquexia cardíaca, uma vez que diferentes fatores como: redução da massa corporal acompanhada pela redução da massa gorda e da massa muscular, aumento da massa isenta de gordura (edema intersticial) e a alta mortalidade, são comumente observados nesta condição.

Rarefação vascular

Alterações no metabolismo energético durante a realização de esforços físicos podem ser os fatores causais da menor capacidade funcional dos portadores de IC. Em cardiopatas, o acionamento precoce do metabolismo anaeróbio leva a maior acúmulo de lactato para uma determinada intensidade de esforço (VESCOVO, 2002). Essa resposta pode também estar associada a um comprometimento da perfusão da musculatura ativa (ROVEDA, MIDDLEKAUFF, RONDON, REIS, SOUZA, NASTARI, BARRETTO, KRIEGER & NEGRAO, 2003; SCHULZE et al., 2002; SULLIVAN, KNIGHT, HIGGINBOTHAM & COBB, 1989; VESCOVO, AMBROSIO & DALLA LIBERA, 2001; WILSON et al., 1984), assim como a uma rarefação vascular

(ROVEDA et al., 2003). Entretanto, existem alguns conflitos na literatura quanto à redução da perfusão muscular nesta síndrome, uma vez que determinados trabalhos na literatura não verificam essa diminuição (MANCINI, COYLE, COGGAN, BELTZ, FERRARO, MONTAIN & WILSON, 1989; MANCINI, FERRARO, TUCHLER, CHANCE & WILSON, 1988; MASSIE, CONWAY, YONGE, FROSTICK, LEDINGHAM, SLEIGHT, RADDA & RAJAGOPALAN, 1987; WIENER, FINK, MARIS, JONES, CHANCE & WILSON, 1986; WILSON, FINK, MARIS, FERRARO, POWER-VANWART, ELEFF & CHANCE, 1985). No entanto, mesmo que a perfusão sangüínea não influencie diretamente no estabelecimento da fadiga muscular, a constante inadequação de oxigênio pode contribuir para o surgimento de alterações metabólicas e morfológicas, que por sua vez, poderão contribuir para a redução da performance desses pacientes (LUNDE et al., 2001a). Dessa forma, é importante considerar alguns fatores que podem influenciar em diferentes respostas na capilarização de pacientes portadores de IC, como a gravidade da doença, o grupo muscular estudado, o uso e o tipo de medicamento e a metodologia empregada para a quantificação dos capilares. Quando essa avaliação é realizada em modelo experimental, também é importante observar a forma de indução da IC, a caracterização da IC no modelo estudado, a fase de desenvolvimento da doença em que foram realizadas as análises e o tipo de músculo esquelético escolhido para o estudo. Além disso, quando o estudo inclui alguma terapia, também é crucial avaliar o período de tratamento para as observações do efeito da terapia, visto que as adaptações na musculatura esquelética são sempre mais tardias do que as observadas no tecido cardíaco (LUNDE et al., 2001a).

No modelo genético de cardiomiopatia por hiperatividade simpática foi avaliada a capilarização nos músculos sóleo, plantar e na porção branca do músculo gastrocnêmio nas diferentes fases da cardiomiopatia. O grupo KO apresentou rarefação vascular aos sete meses de idade no músculo sóleo. Em uma etapa posterior, a razão capilar para cada tipo de fibra foi analisada e não se observou diferença entre os grupos estudados quando comparados aos animais controle da mesma faixa etária. Essa resposta sugere que a rarefação vascular ocorre no músculo como um todo, não estando limitada a um determinado tipo de fibra.

No músculo plantar não foram observadas diferenças nem na densidade vascular e nem na razão capilar por tipo de fibra aos sete meses de idade, entretanto aos três meses de idade, houve uma tendência à diminuição ($p= 0,056$) no grupo KO, que pode ser explicada devido ao aumento na porcentagem de fibras do tipo IIB observadas nesse músculo. Esses resultados reforçam a idéia de que as alterações músculo-esqueléticas induzidas pela IC são músculo-dependentes, pois, além do músculo plantar, outro músculo cuja composição é preferencialmente de fibras glicolíticas, a porção branca do músculo gastrocnêmio, foi avaliado nos camundongos KO e controle aos três e cinco meses de idade. Diferente do observado no músculo plantar, em ambas faixas etárias foi possível constatar rarefação vascular no grupo KO. Talvez, aos três meses de idade essa rarefação possa ocorrer em consequência do aumento de fibras glicolíticas (como observado no plantar), que pode ser explicado pela ação da hiperatividade simpática (discutido mais adiante), entretanto, a avaliação da tipagem de fibras não foi realizada neste músculo. Já aos sete meses de idade, essa rarefação pode estar associada ao desenvolvimento do quadro de IC observado nesse modelo.

Em conjunto, esses resultados sugerem que no modelo genético de hiperatividade simpática na fase em que a cardiomiopatia é grave, ou seja, aos sete meses de idade, a rarefação vascular apresentada em alguns músculos, pode culminar em redução da perfusão muscular. Além disso, outro fator que também pode contribuir para a menor perfusão tecidual neste modelo, embora não avaliado, é a vasoconstrição vascular mediante a exacerbação simpática observada nesses animais. No entanto, até o momento as ferramentas utilizadas não foram suficientes para afirmar a redução da perfusão tecidual no grupo KO, para isso será necessário ampliar o número de experimentos para a avaliação das alterações extrínsecas à musculatura esquelética nesse modelo.

Caracterização bioquímica do músculo esquelético

Alterações metabólicas no músculo esquelético em decorrência da IC já vêm sendo descritas como um dos marcadores desta síndrome, além de

apresentarem alta correlação com a intolerância ao esforço. Parte destas desordens metabólicas é causada por redução da densidade capilar que resulta em inadequado aporte sangüíneo, alteração de fosfatos de alta energia (ATP, CP e Pi), diminuição no volume e na densidade mitocondrial e diminuição na atividade de enzimas oxidativas (BRUNOTTE et al., 1995; DELP et al., 1997; SIMONINI et al., 1996). Para caracterizar com mais segurança o papel da IC nas alterações metabólicas torna-se também importante considerar outros fatores que podem afetar o metabolismo muscular, tais como o envelhecimento e seu efeito sobre a atividade enzimática.

O envelhecimento resulta em uma gradual perda de função muscular. Além da diminuição na área de seção transversa, também é observada a gradual perda de fibras musculares. Dentre os diferentes tipos de fibras, as fibras do tipo II são as mais afetadas pelo envelhecimento, acarretando num aumento da porcentagem de fibras do tipo I, o que contribui para a diminuição da atividade de enzimas glicolíticas, embora essa alteração tenha sido reportada com menor frequência (CRESS, BYMES, DICKINSON & FOSTER, 1984; KIRKENDALL & GARRETT, 1998). De fato, aos sete meses de idade o grupo KO apresentou diminuição da atividade máxima da enzima hexoquinase no músculo sóleo, e tendência à redução na porção vermelha do músculo gastrocnêmio ($p=0,07$) em relação ao grupo KO aos três meses de idade. Essa redução foi mais evidente no grupo KO, visto que aos três meses de idade a atividade da hexoquinase apresentava-se aumentada (embora sem diferença significativa) em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que em músculos cujo componente oxidativo é grande, o envelhecimento pode ter sido o fator determinante da redução da atividade da enzima glicolítica no grupo KO. Por outro lado, a atividade da enzima citrato sintase, não apresentou alterações entre os três e sete meses de idade nos grupos estudados. No entanto, como citado por AOYAGI & SHEPHARD (1992) (AOYAGI & SHEPHARD, 1992) essa inalteração da atividade de enzimas oxidativas com a idade pode ser um efeito “mascarado” pelo aumento na porcentagem de fibras musculares oxidativas.

Outro fator a ser analisado independente da IC é o efeito da exacerbação simpática sob a atividade enzimática. Como explicado anteriormente, aos três meses de idade os camundongos KO não apresentam o quadro de IC, portanto, o efeito

observado na atividade enzimática nessa faixa etária pode ser devido à exacerbação simpática presente nesses animais. Quando avaliada a atividade máxima da enzima hexoquinase, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos estudados. Da mesma forma, não foi observado nenhum efeito da hiperatividade simpática sob a atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo e na porção vermelha do músculo gastrocnêmio. No entanto, a porção branca do músculo gastrocnêmio apresentou a atividade dessa enzima aumentada no grupo KO em relação ao grupo controle aos três meses de idade. Esse resultado foi surpreendente, uma vez que a composição de fibras neste músculo é predominantemente glicolítica, e o resultado ativação simpática nessas fibras, via receptor β_2 - adrenérgico, leva a inibição da síntese de glicogênio e ao aumento da glicogenólise, diferente das fibras do tipo I, cuja ativação simpática estimula a lipólise (JENSEN et al., 2002; RICHTER, RUDERMAN & GALBO, 1982; RICHTER, RUDERMAN, GAVRAS, BELUR & GALBO, 1982).

Até o momento, foram discutidos diferentes fatores que poderiam contribuir para a alteração na atividade enzimática nos diferentes músculos entre os grupos estudados. Contudo, na faixa etária de sete meses de idade, o fator determinante das alterações enzimáticas, foi o desenvolvimento da IC. Dentre os efeitos deletérios da IC no tecido muscular esquelético, a redução da atividade oxidativa é um marcador dessa síndrome, pois vêm sendo relatado repetidamente em vários estudos (LUNDE et al., 2001a; SCHULZE et al., 2002). Igualmente, nesse modelo de IC, foi observada diminuição da atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo sóleo. No entanto, o mesmo não foi observado nos demais músculos. Diferente das enzimas oxidativas, na IC, a atividade de enzimas glicolíticas não está bem definida, uma vez que diferentes estudos demonstram redução (DELP et al., 1997) ou inalteração dessas enzimas (BRUNOTTE et al., 1995). Nos resultados obtidos pela avaliação da atividade máxima da enzima hexoquinase não foi observada nenhuma alteração dessa enzima entre os grupos controle e KO, o que sugere, que a atividade da enzima hexoquinase não foi afetada pela IC nesse modelo de hiperatividade simpática.

Caracterização fenotípica da musculatura esquelética

Distribuição de fibras musculares

Como observado na seção de resultados, o grupo KO aos sete meses de idade apresentou alteração no padrão de distribuição de fibras do músculo sóleo. Esta alteração ocorreu por diminuição na porcentagem de fibras do tipo I e aumento na porcentagem de fibras do tipo IIA. Esses resultados demonstram que as alterações na distribuição de fibras ocorrem em direção a fibras glicolíticas, o que corrobora os dados da literatura, pois, dentre as modificações estruturais da musculatura esquelética observada no desenvolvimento da IC, destacam-se alterações no tipo de fibra muscular, onde se observa uma redução da porcentagem de fibras do tipo I oxidativa (resistente à fadiga) e o aumento de fibras do tipo II (oxidativas e glicolíticas, menos resistentes à fadiga) (DREXLER, RIEDE, MUNZEL, KONIG, FUNKE & JUST, 1992; MANCINI et al., 1989; MANCINI, WALTER, REICHEK, LENKINSKI, MCCULLY, MULLEN & WILSON, 1992; SULLIVAN, GREEN & COBB, 1990). Interessante notar que aos cinco meses de idade, camundongos KO já apresentavam aumento na porcentagem de fibras do tipo IIA. De fato, nessa faixa etária a diferença entre os grupos se acentuou ainda mais, devido a uma redução na porcentagem de fibras do tipo IIA do grupo controle em relação ao grupo controle aos três meses de idade. Esses resultados incentivaram a busca por possíveis mecanismos envolvidos no aumento de fibras oxidativas ao longo da idade no grupo controle, e foi observado na literatura que durante o envelhecimento ocorre conversão das fibras do tipo II para tipo I (HOUMARD, WEIDNER, GAVIGAN, TYNDALL, HICKEY & ALSHAMI, 1998; MUSARO & ROSENTHAL, 1999), o que poderia resultar na redução da capacidade de gerar força e potência em músculos senescentes. Esse aumento na porcentagem de fibras do tipo I ocorre como consequência da diminuição do número de fibras do tipo II. Além disso, a denervação observada nesta fase, atinge principalmente fibras do tipo II acarretando na atrofia dessas fibras. Na tentativa de minimizar a perda de fibras, os motoneurônios das fibras do tipo I se expandem para as fibras do tipo II denervadas, resultando em uma massa muscular menor e com um maior percentual de fibras oxidativas (KIRKENDALL & GARRETT, 1998). Realmente, ao ser analisada a porcentagem

das fibras intermediárias nos grupos controle e KO, foi constatado aumento significativo da porcentagem dessas fibras nos camundongos controle aos cinco meses comparados aos três meses de idade. Sendo esse, portanto, um efeito do avanço da idade nesses animais. Importante destacar que os animais KO além de não acompanharem esse aumento de fibras do tipo I com a idade, eles também apresentam diminuição progressiva na porcentagem dessas fibras, com diferença significativa aos sete meses de idade ($p=0,01$), fase em que a cardiomiopatia é grave e associada à IC.

Diferente do observado no músculo sóleo, a distribuição de fibras no músculo plantar apresentou um padrão diferenciado. Aos três meses de idade, camundongos KO apresentaram mudança na distribuição de fibras (tipo IIA $\rightarrow$ IIB). Sabendo-se que nessa faixa etária, esses animais apresentam um quadro de cardiomiopatia ainda em estágio inicial, provavelmente a diminuição na porcentagem das fibras do tipo IIA pode estar associada a hiperatividade simpática observada no modelo. De fato, diversos estudos demonstraram que a administração de clenbuterol (agonista β_2 - adrenérgico) promove distintas adaptações na musculatura esquelética, dentre elas, mudança na distribuição e no diâmetro de miócitos esqueléticos (STEVENS, FIRINGA, GOHLSCH, BASTIDE, MOUNIER & PETTE, 2000; YIMLAMAI et al., 2005). Da mesma forma, foram encontrados resultados semelhantes aos achados da literatura, onde observou-se mudança no tipo de fibra em direção a um perfil mais glicolítico. Outro fato importante, é que essas alterações provocadas pela hiperatividade simpática parecem ser músculo-dependentes, pois no músculo sóleo, aos três meses de idade os animais KO não apresentaram o mesmo padrão de alteração. Realmente, já foi demonstrado que os músculos compostos principalmente por fibras de contração rápida apresentam maiores adaptações anabólicas ao estímulo β_2 -adrenérgico quando comparados aos músculos de contração lenta, pois, mesmo havendo uma maior densidade de receptores nas fibras do tipo I, a taxa de internalização dos mesmos quando ativados pelo agonista é maior (JENSEN et al., 2002; KIM et al., 1991). No entanto, mesmo sendo consenso que o estímulo β_2 - adrenérgico aumenta o percentual de fibras glicolíticas, devido a existência de muitos estudos controversos na literatura, ainda

não está bem estabelecido o efeito deste estímulo na transição de fibras em diferentes músculos esqueléticos (YANG & MCELLIGOTT, 1989), dificultando o entendimento das distintas alterações.

Uma outra possível explicação se refere à espécie animal utilizada no presente projeto. Os camundongos, principalmente os da linhagem C57/BL6, apresentam um padrão de distribuição de fibras diferenciado do observado em ratos e humanos. Em ratos a porcentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo é $\geq 85\%$ (AOKI, MIYABARA, SOARES, SALVINI & MORISCOT, 2006; GARDETTO, SCHLUTER & FITTS, 1989; REISER, KASPER & MOSS, 1987), já em camundongos o percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo é $\sim 26\%$, dependendo da linhagem estudada (CARLSON, BOOTH & GORDON, 1999; HAIDA, FOWLER, ABRESCH, LARSON, SHARMAN, TAYLOR & ENTRIKIN, 1989; MARECHAL & BECKERS-BLEUKX, 1993; WARREN, HAYES, LOWE, WILLIAMS & ARMSTRONG, 1994; WERNIG, IRINTCHEV & WEISSHAUPT, 1990). Dessa forma, o potencial de alteração das fibras do tipo I em direção a fibras do tipo IIA no músculo sóleo é menor quando comparado a mamíferos maiores (HARRISON, ALLEN, GIRTEN, STODIECK, KOSTENUK, BATEMAN, MORONY, LACEY & LEINWAND, 2003). Portanto, em camundongos, para indução na transição de fibras musculares no sentido de fibras glicolíticas, é necessário um estímulo mais intenso. Conseqüentemente, sendo essa uma limitação desse modelo, e talvez uma possível explicação para a pequena magnitude de alteração do tipo de fibra observada neste modelo de IC aos sete meses de idade e a não alteração no padrão de fibras aos três meses no músculo sóleo.

Área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras

Na IC, além da transição do tipo de fibra no músculo esquelético, também é observado o estabelecimento do quadro de atrofia muscular. Segundo LUNDE et al. (2001) (LUNDE et al., 2001a), diferente da mudança do padrão dos tipos de fibras, a atrofia muscular nem sempre é observada nos modelos experimentais de IC, pois, a redução da área de secção transversa geralmente ocorre nos quadros mais graves

da doença. Os achados deste projeto corroboram os dados da literatura, pois somente aos sete meses de idade, os camundongos KO apresentaram diminuição da área de secção transversa nas fibras do tipo I, nas fibras intermediárias e nas fibras do tipo IIA no músculo sóleo. Dentre os diferentes tipos de fibras, as fibras do tipo II são as que mais apresentam atrofia na IC (LIBERA et al., 1999; VESCOVO, AMBROSIO & DALLA LIBERA, 2001), da mesma forma, foi observado nesse modelo de IC que aos sete meses de idade, a maior diminuição da área de secção transversa foi nas fibras do tipo IIA.

No músculo plantar, além da mudança do tipo de fibras, a estimulação simpática também promoveu aumento na área de secção transversa em camundongos KO aos três meses de idade. Como discutido anteriormente, esse aumento no tamanho do miócito esquelético em decorrência da estimulação adrenérgica já é bem descrito na literatura, embora pouco se saiba sobre a interação entre mecanismos envolvidos na regulação da massa muscular e a via de sinalização β_2 -adrenérgica. Alguns autores atribuem esse efeito anabólico devido a inibição no sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} (NAVEGANTES et al., 2001), pois foi demonstrado, que o tratamento com agonista β_2 -adrenérgico reverte a depressão na velocidade máxima da proteína SERCA observada no envelhecimento, e aumenta a atividade da calpastatina, um inibidor das calpaínas (HIGGINS et al., 1988). Na fase em que é observado o estabelecimento do quadro de IC, aos sete meses de idade, os camundongos KO além de não manterem esse aumento da área de secção transversa observado aos três meses, também apresentaram atrofia nas fibras do tipo IIB, quando comparados ao grupo controle da mesma faixa etária. Semelhante aos resultados da área de secção transversa das fibras musculares, também foi observado aumento na área total do músculo plantar aos três meses de idade no grupo KO e progressiva atrofia ao longo dos meses, com diferença significativa aos sete meses de idade quando comparado ao grupo controle da mesma faixa etária.

A partir desses resultados, é evidente que na fase em que a IC é grave, músculos com diferentes composições de fibras apresentam o mesmo padrão de atrofia muscular. Logo, como citado anteriormente, essa perda acentuada de massa muscular associada a outros fatores pode acarretar no quadro de caquexia cardíaca,

que é considerado um marcador independente de mortalidade nessa síndrome. Entretanto, embora a perda de massa muscular no portador de IC seja notória, as vias intracelulares envolvidas no estado catabólico destes pacientes ainda não estão esclarecidas. Provavelmente, a atrofia muscular na IC grave pode estar associada tanto ao declínio nas vias de síntese protéica, quanto à ativação nas vias de degradação protéica. O desequilíbrio entre as vias de síntese e degradação protéica vêm sendo demonstrado para doenças sistêmicas como neoplasias, AIDS, diabetes e sepsis, que culminam no quadro de caquexia (JACKMAN & KANDARIAN, 2004). Com base nos estudos dessas doenças e nas evidências sobre a IC, a atrofia muscular desencadeada na IC pode estar relacionada com o aumento local e sistêmico de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e IL1 (SCHULZE et al., 2002), e redução na ativação de vias de síntese tanto pela diminuição na expressão de IGF-1 muscular (MGF; Mechano Growth Factor) quanto nas concentrações de IGF-1 circulante (HAMBRECHT et al., 2002; SCHULZE et al., 2002), que é um potente regulador trófico do músculo esquelético por acionar vias de síntese protéica, e inibir vias de degradação. Uma das vias ativadas por IGF-1 com papel crucial no aumento do trofismo muscular é a via de sinalização Akt/mTOR (GLASS, 2003). Dados recentes mostram que esta via é fundamental para o crescimento do músculo esquelético frente à demanda mecânica aumentada em modelo de ablação (remoção de músculos flexores plantares, com exceção do plantar) e também estiramento contínuo (AOKI, MIYABARA, SOARES, SAITO & MORISCOT, 2006). Além disto, já foi mostrado que em modelo de imobilização, camundongos que superexpressam Akt são resistentes à perda de massa muscular (SANDRI, SANDRI, GILBERT, SKURK, CALABRIA, PICARD, WALSH, SCHIAFFINO, LECKER & GOLDBERG, 2004). Em contrapartida, camundongos com deleção dos genes da AKT1 e AKT2 apresentam músculos de menor tamanho (PENG, XU, CHEN, HAHN-WINDGASSEN, SKEEN, JACOBS, SUNDARARAJAN, CHEN, CRAWFORD, COLEMAN & HAY, 2003). Além disso, a inibição dessa via reduz o tamanho de miotúbulos em cultura (ROMMEL, BODINE, CLARKE, ROSSMAN, NUNEZ, STITT, YANCOPOULOS & GLASS, 2001) e ativa vias da subfamília dos fatores de transcrição *forkhead Box O* (FOXO), que quando ativados são responsáveis pela transativação de genes constituintes do sistema proteolítico dirigido pelo proteassoma, especialmente pelas ubiquitina

ligases, conhecido como sistema ubiquitina-proteossoma (LEE, DAI, HU, WANG, DU & MITCH, 2004; MITCH & GOLDBERG, 1996).

Com base nessas evidências, é possível especular que as alterações no trofismo muscular observada no modelo genético de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática podem ser decorrentes de alteração nas vias de sinalização supracitadas. Mediante aos resultados do estudo de caracterização fenotípica do músculo esquelético desses animais, é possível afirmar que esse modelo de IC dispõe de uma importante ferramenta para a realização de futuros projetos cujo enfoque será investigar alterações músculo-esqueléticas decorrentes da IC. Dessa forma, com base na relevância clínica dessas alterações no prognóstico de portadores de IC, será a próxima etapa desse projeto, estudar diferentes vias de sinalização envolvidas na síntese protéica, a fim de obter-se uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na atrofia muscular observada na IC. Além disso, também será objetivo do projeto de doutorado, avaliar a regulação da massa muscular nesse modelo de IC perante as diferentes estratégias terapêuticas: o treinamento físico e a suplementação de aminoácidos, visto que ambas intervenções são conhecidas por estimularem a via Akt/mTOR.

Em resumo, no presente estudo foi possível constatar uma importante alteração resultante do quadro de IC que é fundamental para o mau prognóstico da síndrome e está vinculada à disfunção muscular esquelética, a intolerância a realização ao esforço físico. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, é possível explicar as possíveis causas da intolerância nesse modelo de IC (FIGURA 34). Um fator que contribui em parte para essa menor capacidade de realização de esforço é a diminuição no consumo máximo de oxigênio. Embora essa medida não tenha sido realizada, é possível inferir, por intermédio da disfunção ventricular observada, que esses animais podem apresentar um menor débito cardíaco e, portanto, uma menor oferta de oxigênio. Além disso, o edema pulmonar observado nesta fase, além de representar um sinal clínico de IC, também pode dificultar a melhor captação de oxigênio devido a redução na complacência pulmonar e ao aumento resistência das vias aéreas. Em nível muscular, também foi observada rarefação vascular que pode levar a uma perfusão inadequada. No entanto, como

discutido anteriormente, a inadequada oferta de oxigênio é pouco correlacionada com a redução da capacidade física em pacientes portadores de IC, porém, episódios constantes de indisponibilidade de oxigênio podem contribuir para alterações intrínsecas à musculatura esquelética, que por sua vez, conduzem ao quadro de intolerância ao esforço. Dentre as alterações intrínsecas observadas neste estudo, pode-se destacar, a redução da atividade máxima da enzima citrato sintase, o aumento na porcentagem de fibras glicolíticas e a atrofia muscular. Em conjunto, esses resultados podem explicar a antecipação da fadiga, e como consequência desta, a intolerância ao esforço observada neste modelo.

Além da intolerância à realização de esforço, uma outra condição importante para o mau prognóstico de pacientes portadores de IC, que está diretamente relacionado com a miopatia muscular esquelética, é a caquexia cardíaca. Os resultados obtidos nesse estudo como: a menor massa corpórea acompanhada pela atrofia muscular e redução de gordura corporal, o aumento da massa isenta de gordura, representando o edema intersticial e a alta mortalidade, são comumente observados nesta condição. No entanto, para melhor confirmar a caquexia neste modelo de IC, será realizado em um próximo projeto a dosagem das concentrações plasmáticas e a expressão muscular de citocinas pró-inflamatórias, que são consideradas marcadores dessa condição. Além de ser a caquexia cardíaca tida como preditor independente de mortalidade em pacientes portadores de IC, a sua condição reforça ainda mais um estilo de vida sedentário, que por sua vez contribui para um maior agravamento morfo-funcional da musculatura esquelética, levando a um círculo vicioso e a piora do prognóstico do paciente.

Por fim, como parte deste estudo, é importante considerar o efeito da ativação simpática na musculatura esquelética, levando em consideração a natureza do modelo experimental. Aos três meses de idade, fase em que não são observados sinais clínicos de IC, as alterações musculares observadas nessa fase podem ser relacionadas com o efeito da exacerbação simpática. Os resultados obtidos foram similares aos relatados na literatura, onde foram utilizados agonistas β_2 -adrenérgico. Observou-se um efeito anabólico e aumento no percentual de fibras glicolíticas no músculo plantar. No entanto, durante o estabelecimento do quadro de IC, mesmo

com o aumento gradual nas concentrações plasmáticas de noradrenalina, o efeito da IC pareceu sobrepor o efeito da ativação simpática, em virtude da constatação de atrofia muscular. Uma hipótese, é que a constante ativação dos receptores β_2 -adrenérgico, acarreta em uma diminuição da densidade dos mesmos, o que pode levar a prejuízos musculares esqueléticos, visto que embora pouco conhecido, a via de sinalização β_2 -adrenérgica parece exercer importante função na musculatura esquelética.

FIGURA 34 - Esquema do resumo de resultados apresentados neste projeto.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os camundongos com deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} -adrenérgicos apresentam alterações funcionais, bioquímicas e estruturais da musculatura esquelética semelhantes às observadas nos demais modelos de IC e em indivíduos portadores dessa síndrome. Essas alterações ocorrem em uma fase mais tardia, em que a cardiomiopatia é grave, associada a edema pulmonar e alta mortalidade. Além disso, com base nos resultados expostos também é possível afirmar que nesta fase a IC está associada à caquexia muscular. Portanto, o modelo de cardiomiopatia por hiperatividade do sistema nervoso simpático é um ótimo modelo experimental para estudos de futuras estratégias terapêuticas que visem à melhoria da musculatura esquelética como parte do tratamento da IC. Do mesmo modo, esses animais também permitirão o estudo das vias intracelulares envolvidas na regulação da massa muscular, visto que a atrofia muscular presente neste modelo, é um dos marcadores dessa síndrome.

REFERÊNCIAS

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. The Biochemical Journal, v.154, n.3, p.689-700, 1976

ALTMAN, J. D.; TRENDELENBURG, A. U.; MACMILLAN, L.; BERNSTEIN, D.; LIMBIRD, L.; STARKE, K.; KOBILKA, B. K.; HEIN, L. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A- adrenergic receptor knockout mice. Molecular Pharmacology, v.56, n.1, p.154-61., 1999

ANKER, S. D.; SWAN, J. W.; VOLTERRANI, M.; CHUA, T. P.; CLARK, A. L.; POOLE-WILSON, P. A.; COATS, A. J. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. European Heart Journal, v.18, n.2, p.259-69, 1997

AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H.; SOARES, A. G.; SAITO, E. T.; MORISCOT, A. S. mTOR pathway inhibition attenuates skeletal muscle growth induced by stretching. Cell and Tissue Research, v.324, n.1, p.149-56, 2006

AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H.; SOARES, A. G.; SALVINI, T. F.; MORISCOT, A. S. Cyclosporin-A does not affect skeletal muscle mass during disuse and recovery. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, n.2, p.243-51, 2006

AOYAGI, Y.; SHEPHARD, R. J. Aging and muscle function. Sports Medicine, v.14, n.6, p.376-96, 1992

BARLOW, C. W.; QAYYUM, M. S.; DAVEY, P. P.; CONWAY, J.; PATERSON, D. J.; ROBBINS, P. A. Effect of physical training on exercise-induced hyperkalemia in chronic heart failure. Relation with ventilation and catecholamines. Circulation, v.89, n.3, p.1144-52, 1994

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. Physiological Reviews, v.80, n.3, p.1215-65, 2000

BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. Physiological Genomics, v.13, n.3, p.217-26, 2003. New York.

BLANKESTIJN, P. J. Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease. Nephrology Dialyse Transplantation, v.19, n.6, p.1354-7, 2004. Bethesda.

BOOTH, F. W.; GOLLNICK, P. D. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. Medicine and Science in Sports and Exercise, v.15, n.5, p.415-20, 1983

BOWERS, R. R.; GETTYS, T. W.; PRPIC, V.; HARRIS, R. B.; BARTNESS, T. J. Short photoperiod exposure increases adipocyte sensitivity to noradrenergic stimulation in Siberian hamsters. American Journal of Physiology American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology, v.288, n.5, p.R1354-60, 2005. Bethesda.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry, v.72, p.248-54, 1976. New York.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: E. H.J. (Ed.). Experiments in Personality, Psychogenetics and Psychopharmacology. London: Routledge & Kegan Paul, v.1, 1960. Experiments in psychogenetics, p.3-102

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? Archives of Neurology, v.23, n.4, p.369-79, 1970

BROWN, L. The Criteria Committee of New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. Boston: Mass: Little, Brown & Co. 1994. 253-256 p.

BRUM, P. C.; KOSEK, J.; PATTERSON, A.; BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, v.283, n.5, p.H1838-45, 2002. Bethesda.

BRUM, P. C.; ROLIM, N. P.; BACURAU, A. V.; MEDEIROS, A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. Anais Academia Brasileira de Ciências, v.78, n.3, p.485-503, 2006. Rio de Janeiro.

BRUNOTTE, F.; THOMPSON, C. H.; ADAMOPOULOS, S.; COATS, A.; UNITT, J.; LINDSAY, D.; KAKLAMANIS, L.; RADDA, G. K.; RAJAGOPALAN, B. Rat skeletal muscle metabolism in experimental heart failure: effects of physical training. Acta Physiologica Scandinavica, v.154, n.4, p.439-47, 1995

BUENO JUNIOR, C. R.; BACURAU, A. V.; JARDIM, M.; BRUM, P. C. Exercise training restore Ca handling protein expression in a genetic model of cardiomyopathy

induced by sympathetic hiperactivity [Abstract]. Frontiers in Myogenesis, v.1, p.35, 2006

BULLER, N. P.; JONES, D.; POOLE-WILSON, P. A. Direct measurement of skeletal muscle fatigue in patients with chronic heart failure. British Heart Journal, v.65, n.1, p.20-4, 1991

CARLSON, C. J.; BOOTH, F. W.; GORDON, S. E. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. The American Journal of Physiology, v.277, n.2 Pt 2, p.R601-6, 1999

COLUCCI, W. S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. Clinical Cardiology, v.21, n.12 Suppl 1, p.I20-4, 1998. New York.

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. The Biochemical Journal, v.126, n.1, p.49-58, 1972

CRESS, M. E.; BYMES, W. C.; DICKINSON, A. L.; FOSTER, V. L. Modification of Type II fiber atrophy and LDH isozyme component of an 8 week endurance training program in elderly women [Abstract]. Medicine and Science in Sport and Exercise, v.16, p.105, 1984

DE SIMONE, G.; PALMIERI, V. [Echocardiographic evaluation of ventricular hypertrophy]. Recent Progression Medicine, v.93, n.1, p.58-62, 2002. Dallas.

DELP, M. D.; DUAN, C.; MATTSON, J. P.; MUSCH, T. I. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. Journal of Applied Physiology, v.83, n.4, p.1291-9, 1997

DHALLA, N. S.; AFZAL, N.; BEAMISH, R. E.; NAIMARK, B.; TAKEDA, N.; NAGANO, M. Pathophysiology of cardiac dysfunction in congestive heart failure. The Canadian Journal of Cardiology, v.9, n.10, p.873-87, 1993

DREXLER, H.; RIEDE, U.; MUNZEL, T.; KONIG, H.; FUNKE, E.; JUST, H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. Circulation, v.85, n.5, p.1751-9, 1992

ELFELLAH, M. S.; DALLING, R.; KANTOLA, I. M.; REID, J. L. Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. British Journal of Clinical Pharmacology, v.27, n.1, p.31-8, 1989

ESLER, M. Sympathetic nervous system: contribution to human hypertension and related cardiovascular diseases. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v.26 Suppl 2, p.S24-8, 1995

ESLER, M.; JENNINGS, G.; BIVIANO, B.; LAMBERT, G.; HASKING, G. Mechanism of elevated plasma noradrenaline in the course of essential hypertension. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v.8 Suppl 5, p.S39-43, 1986

FERREIRA, A. J.; EVANGELISTA, F. S.; BACURAU, A. V.; TEIXEIRA, L. C.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; CASARINI, D.; OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E.; BRUM, P. C. Cardiac And Circulating Components Of The Sympathetic And Renin Angiotensin Systems During The Development Of Heart Failure In Mice [Abstract]. The Faseb Journal, v.20, p.312, 2006

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N.; GRANÁ, O.; BARTHOLOMEU, J., B.; BRUM, P. C. Padronização da intensidade de treinamento físico aeróbio em esteira para camundongos. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, v.14, n.3, p.74, 2004. São Paulo.

FIGUEROA, M. S.; PETERS, J. I. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. Respiratory Care, v.51, n.4, p.403-12, 2006. New York.

FINK, L. I.; WILSON, J. R.; FERRARO, N. Exercise ventilation and pulmonary artery wedge pressure in chronic stable congestive heart failure. The American Journal of Cardiology, v.57, n.4, p.249-53, 1986

FRANCIOSA, J. A.; PARK, M.; LEVINE, T. B. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. The American Journal of Cardiology, v.47, n.1, p.33-9, 1981

FREEMAN, L. M.; ROUBENOFF, R. The nutrition implications of cardiac cachexia. Nutrition Reviews, v.52, n.10, p.340-7, 1994

FRIGERIO, M.; ROUBINA, E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. American Journal of Cardiology, v.96, n.12A, p.10L-18L, 2005. Dallas.

GARDETTO, P. R.; SCHLUTER, J. M.; FITTS, R. H. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. Journal of Applied Physiology, v.66, n.6, p.2739-49, 1989

GLASS, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. Trends in Molecular Medicine, v.9, n.8, p.344-50, 2003

GUAZZI, M.; PALERMO, P.; PONTONE, G.; SUSINI, F.; AGOSTONI, P. Synergistic efficacy of enalapril and losartan on exercise performance and oxygen consumption at peak exercise in congestive heart failure. American Journal of Cardiology, v.84, n.9, p.1038-43, 1999. Madison.

HAIDA, N.; FOWLER, W. M., JR.; ABRESCH, R. T.; LARSON, D. B.; SHARMAN, R. B.; TAYLOR, R. G.; ENTRIKIN, R. K. Effect of hind-limb suspension on young and adult skeletal muscle. I. Normal mice. Experimental Neurology, v.103, n.1, p.68-76, 1989

HAMALAINEN, N.; PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v.41, n.5, p.733-43, 1993

HAMBRECHT, R.; SCHULZE, P. C.; GIELEN, S.; LINKE, A.; MOBIUS-WINKLER, S.; YU, J.; KRATZSCH, J. J.; BALDAUF, G.; BUSSE, M. W.; SCHUBERT, A.; ADAMS, V.; SCHULER, G. Reduction of insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of noncachectic patients with chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology, v.39, n.7, p.1175-81, 2002

HARRIDGE, S. D.; MAGNUSSON, G.; GORDON, A. Skeletal muscle contractile characteristics and fatigue resistance in patients with chronic heart failure. European Heart Journal, v.17, n.6, p.896-901, 1996

HARRINGTON, D.; ANKER, S. D.; CHUA, T. P.; WEBB-PEPLOE, K. M.; PONIKOWSKI, P. P.; POOLE-WILSON, P. A.; COATS, A. J. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology, v.30, n.7, p.1758-64, 1997

HARRISON, B. C.; ALLEN, D. L.; GIRTEN, B.; STODIECK, L. S.; KOSTENUK, P. J.; BATEMAN, T. A.; MORONY, S.; LACEY, D.; LEINWAND, L. A. Skeletal muscle adaptations to microgravity exposure in the mouse. Journal of Applied Physiology, v.95, n.6, p.2462-70, 2003

HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MUCKE, S.; MULLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. International Journal of Sports Medicine, v.6, n.3, p.117-30, 1985

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature, v.402, n.6758, p.181-4., 1999

HEIN, L.; LIMBIRD, L. E.; EGLIN, R. M.; KOBILKA, B. K. Gene substitution/knockout to delineate the role of alpha 2-adrenoceptor subtypes in mediating central effects of catecholamines and imidazolines. Annals of the New York Academy of Sciences, v.881, p.265-71, 1999

HIGGINS, J. A.; LASSLETT, Y. V.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. The relation between dietary restriction or clenbuterol (a selective beta 2 agonist) treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastatin activities in lambs. The British Journal of Nutrition, v.60, n.3, p.645-52, 1988

HOUMARD, J. A.; WEIDNER, M. L.; GAVIGAN, K. E.; TYNDALL, G. L.; HICKEY, M. S.; ALSHAMI, A. Fiber type and citrate synthase activity in the human gastrocnemius and vastus lateralis with aging. Journal of Applied Physiology, v.85, n.4, p.1337-41, 1998

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. American Journal of Physiology Cell Physiology, v.287, n.4, p.C834-43, 2004

JANSSEN, P. The Deflection Point. In: Lactate Threshold Training. Champain, p.pp 300. 2001

JENSEN, J.; BRENNESVIK, E. O.; BERGERSEN, H.; OSELAND, H.; JEBENS, E.; BRORS, O. Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. Pflugers Arch: European Journal of Physiology, v.444, n.1-2, p.213-9, 2002

JENSEN, J.; BRORS, O.; DAHL, H. A. Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. Acta Pharmacologica et Toxicologica, v.76, n.6, p.380-5, 1995

JONDEAU, G.; KATZ, S. D.; ZOHMAN, L.; GOLDBERGER, M.; MCCARTHY, M.; BOURDARIAS, J. P.; LEJEMTEL, T. H. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. Circulation, v.86, n.5, p.1351-6, 1992

KATZ, A. M. Potential deleterious effects of inotropic agents in the therapy of chronic heart failure. Circulation, v.73, n.3 Pt 2, p.III184-90, 1986. Dallas.

KATZ, S. D.; BLEIBERG, B.; WEXLER, J.; BHARGAVA, K.; STEINBERG, J. J.; LEJEMTEL, T. H. Lactate turnover at rest and during submaximal exercise in patients with heart failure. Journal of Applied Physiology, v.75, n.5, p.1974-9, 1993

KIM, Y. S.; LEE, Y. B.; ASHMORE, C. R. Cimaterol-induced growth in rats: growth pattern and biochemical characteristics. Growth, Development, and Aging, v.52, n.1, p.41-5, 1988

KIM, Y. S.; LEE, Y. B.; GARRETT, W. N.; DALRYMPLE, R. H. Effects of cimaterol on nitrogen retention and energy utilization in lambs. Journal of Animal Science, v.67, n.3, p.674-81, 1989

KIM, Y. S.; SAINZ, R. D.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R. J. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. Biochemical Pharmacology, v.42, n.9, p.1783-9, 1991

KIM, Y. S.; SAINZ, R. D.; SUMMERS, R. J.; MOLENAAR, P. Cimaterol reduces beta-adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. Journal of Animal Science, v.70, n.1, p.115-22, 1992

KIRKENDALL, D. T.; GARRETT, W. E., JR. The effects of aging and training on skeletal muscle. The American Journal of Sports Medicine, v.26, n.4, p.598-602, 1998

KOTLER, D. P. Cachexia. Annals of Internal Medicine, v.133, n.8, p.622-34, 2000

LARSEN, A. I.; LINDAL, S.; AUKRUST, P.; TOFT, I.; AARSLAND, T.; DICKSTEIN, K. Effect of exercise training on skeletal muscle fibre characteristics in men with chronic

heart failure. Correlation between skeletal muscle alterations, cytokines and exercise capacity. International Journal of Cardiology, v.83, n.1, p.25-32, 2002

LEE, S. W.; DAI, G.; HU, Z.; WANG, X.; DU, J.; MITCH, W. E. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. Journal of the American Society of Nephrology, v.15, n.6, p.1537-45, 2004

LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier. 1991

LEJEMTEL, T. H. Pathophysiologic relevance of neurohumoral measurements in chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology, v.7, n.4, p.766-7, 1986

LIBERA, L. D.; ZENNARO, R.; SANDRI, M.; AMBROSIO, G. B.; VESCOVO, G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. The American Journal of Physiology, v.277, n.5 Pt 1, p.C982-6, 1999

LUNDE, P. K.; SEJERSTED, O. M.; THORUD, H. M.; TONNESSEN, T.; HENRIKSEN, U. L.; CHRISTENSEN, G.; WESTERBLAD, H.; BRUTON, J. Effects of congestive heart failure on Ca²⁺ handling in skeletal muscle during fatigue. Circulation Research, v.98, n.12, p.1514-9, 2006

LUNDE, P. K.; SJAASTAD, I.; SCHIOTZ THORUD, H. M.; SEJERSTED, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. Acta Physiologica Scandinavica, v.171, n.3, p.277-94, 2001a. Estocolmo.

_____. Skeletal muscle disorders in heart failure. Acta of Physiology Scandinavian, v.171, n.3, p.277-94, 2001b. Estocolmo.

MANCINI, D. M.; COYLE, E.; COGGAN, A.; BELTZ, J.; FERRARO, N.; MONTAIN, S.; WILSON, J. R. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. Circulation, v.80, n.5, p.1338-46, 1989

MANCINI, D. M.; FERRARO, N.; TUCHLER, M.; CHANCE, B.; WILSON, J. R. Detection of abnormal calf muscle metabolism in patients with heart failure using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. The American Journal of Cardiology, v.62, n.17, p.1234-40, 1988

MANCINI, D. M.; WALTER, G.; REICHEK, N.; LENKINSKI, R.; MCCULLY, K. K.; MULLEN, J. L.; WILSON, J. R. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. Circulation, v.85, n.4, p.1364-73, 1992

MANCINI, D. M.; WILSON, J. R.; BOLINGER, L.; LI, H.; KENDRICK, K.; CHANCE, B.; LEIGH, J. S. In vivo magnetic resonance spectroscopy measurement of deoxymyoglobin during exercise in patients with heart failure. Demonstration of abnormal muscle metabolism despite adequate oxygenation. Circulation, v.90, n.1, p.500-8, 1994

MARECHAL, G.; BECKERS-BLEUKX, G. Force-velocity relation and isomyosins in soleus muscles from two strains of mice (C57 and NMRI). Pflügers Archiv : European Journal of Physiology, v.424, n.5-6, p.478-87, 1993

MARKS, A. R. A guide for the perplexed: towards an understanding of the molecular basis of heart failure. Circulation, v.107, n.11, p.1456-9, 2003

MARTIN, W. H., 3RD; MURPHREE, S. S.; SAFFITZ, J. E. Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. Circulation Research, v.64, n.6, p.1096-105, 1989

MASSIE, B.; CONWAY, M.; YONGE, R.; FROSTICK, S.; LEDINGHAM, J.; SLEIGHT, P.; RADDA, G.; RAJAGOPALAN, B. Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure: relation to clinical severity and blood flow. Circulation, v.76, n.5, p.1009-19, 1987

MAZESS, R. B.; BARDEN, H. S.; ETTINGER, M.; JOHNSTON, C.; DAWSON-HUGHES, B.; BARAN, D.; POWELL, M.; NOTELOVITZ, M. Spine and femur density using dual-photon absorptiometry in US white women. Bone and Mineral, v.2, n.3, p.211-9, 1987

MCELLIGOTT, M. A.; BARRETO, A., JR.; CHAUNG, L. Y. Effect of continuous and intermittent clenbuterol feeding on rat growth rate and muscle. Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology, v.92, n.1, p.135-8, 1989

MINOTTI, J. R.; CHRISTOPH, I.; OKA, R.; WEINER, M. W.; WELLS, L.; MASSIE, B. M. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance. The Journal of Clinical Investigation, v.88, n.6, p.2077-82, 1991

MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. The New England Journal of Medicine, v.335, n.25, p.1897-905, 1996

MOLAVI, B.; MEHTA, J. L. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. Current Opinion in Cardiology, v.19, n.5, p.488-93, 2004

MOMKEN, I.; KAHAPIP, J.; BAH, L.; BADOUAL, T.; HITTINGER, L.; VENTURA-CLAPIER, R.; VEKSLER, V. Does angiotensin-converting enzyme inhibition improve the energetic status of cardiac and skeletal muscles in heart failure induced by aortic stenosis in rats? Journal of Molecular and Cellular Cardiology, v.35, n.4, p.399-407, 2003

MOORE, F. D.; OLESEN, K. H.; MCMURRAY, J. D.; PARKER, H. V.; BALL, M. R.; BOYDEN, C. M. The Body Cell Mass and Its Supporting Environment. Philadelphia: Saunders. 1963

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. The American Journal of Clinical Nutrition, v.83, n.4, p.735-43, 2006

MUSARO, A.; ROSENTHAL, N. Transgenic mouse models of muscle aging. Experimental Gerontology, v.34, n.2, p.147-56, 1999

NAVEGANTES, L. C.; RESANO, N. M.; BAVIERA, A. M.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis

in rat skeletal muscle. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v.286, n.4, p.E642-7, 2004

NAVEGANTES, L. C.; RESANO, N. M.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v.281, n.3, p.E449-54, 2001

NEGRAO, C. E.; HAMILTON, M. A.; FONAROW, G. C.; HAGE, A.; MORIGUCHI, J. D.; MIDDLEKAUFF, H. R. Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.278, n.1, p.H168-74, 2000

NERHEIM, P.; BIRGER-BOTKIN, S.; PIRACHA, L.; OLSHANSKY, B. Heart failure and sudden death in patients with tachycardia-induced cardiomyopathy and recurrent tachycardia. Circulation, v.110, n.3, p.247-52, 2004

NIENABER, J. J.; TACHIBANA, H.; NAGA PRASAD, S. V.; ESPOSITO, G.; WU, D.; MAO, L.; ROCKMAN, H. A. Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. Journal of Clinical Investigation, v.112, n.7, p.1067-79, 2003. London.

NISHI, I.; KAWANO, S.; MISAKI, M.; HOSHI, T.; MASUMI, T.; IIDA, K.; WATANABE, S.; YAMAGUCHI, I. Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats. Heart Vessels, v.21, n.4, p.251-5, 2006. New York.

PACKER, M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. Journal of the American College of Cardiology, v.20, n.1, p.248-54., 1992

PAPADIMITRIOU, J. C.; PHELPS, P. C.; SHIN, M. L.; SMITH, M. W.; TRUMP, B. F. Effects of Ca^{2+} deregulation on mitochondrial membrane potential and cell viability in nucleated cells following lytic complement attack. Cell Calcium, v.15, n.3, p.217-27, 1994

PENG, X. D.; XU, P. Z.; CHEN, M. L.; HAHN-WINDGASSEN, A.; SKEEN, J.; JACOBS, J.; SUNDARARAJAN, D.; CHEN, W. S.; CRAWFORD, S. E.; COLEMAN, K. G.; HAY, N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. Genes & Development, v.17, n.11, p.1352-65, 2003

PERREAULT, C. L.; GONZALEZ-SERRATOS, H.; LITWIN, S. E.; SUN, X.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; MORGAN, J. P. Alterations in contractility and intracellular Ca^{2+} transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. Circulation Research, v.73, n.2, p.405-12, 1993

PETERS, D. G.; MITCHELL, H. L.; MCCUNE, S. A.; PARK, S.; WILLIAMS, J. H.; KANDARIAN, S. C. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression in congestive heart failure. Circulation Research, v.81, n.5, p.703-10, 1997

PETERS, D. G.; MITCHELL-FELTON, H.; KANDARIAN, S. C. Unloading induces transcriptional activation of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1 gene in muscle. The American Journal of Physiology, v.276, n.5 Pt 1, p.C1218-25, 1999

PETERS, S. J.; DYCK, D. J.; BONEN, A.; SPRIET, L. L. Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle. The American Journal of Physiology, v.275, n.2 Pt 1, p.E300-9, 1998

PIEPOLI, M. F.; SCOTT, A. C.; CAPUCCI, A.; COATS, A. J. Skeletal muscle training in chronic heart failure. Acta Physiologica Scandinavica, v.171, n.3, p.295-303, 2001

POEHLMAN, E. T.; SCHEFFERS, J.; GOTTLIEB, S. S.; FISHER, M. L.; VAITEKEVICIUS, P. Increased resting metabolic rate in patients with congestive heart failure. Annals of Internal Medicine, v.121, n.11, p.860-2, 1994

POOLE-WILSON, P. A.; FERRARI, R. Role of skeletal muscle in the syndrome of chronic heart failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, v.28, n.11, p.2275-85, 1996

REISER, P. J.; KASPER, C. E.; MOSS, R. L. Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscles. Journal of Applied Physiology, v.63, n.6, p.2293-300, 1987

REMO, E. F. Heart failure management. Prevention of pulmonary edema is essential. Advanced Nurse Practise, v.13, n.12, p.27-8, 30, 62, 2005. New York.

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B.; GALBO, H. Alpha and beta adrenergic effects on metabolism in contracting, perfused muscle. Acta Physiologica Scandinavica, v.116, n.3, p.215-22, 1982

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B.; GAVRAS, H.; BELUR, E. R.; GALBO, H. Muscle glycogenolysis during exercise: dual control by epinephrine and contractions. The American Journal of Physiology, v.242, n.1, p.E25-32, 1982

RODGER, W.; BOWMAN, W. C. Adrenoceptors in skeletal muscle. In: G. Kuno (Ed.). Adrenoceptors and Catecholamine Action. New York: John Wiley & Sons, 1983. Adrenoceptors in skeletal muscle., p.pp 123-155

ROMMEL, C.; BODINE, S. C.; CLARKE, B. A.; ROSSMAN, R.; NUNEZ, L.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nature Cell Biology, v.3, n.11, p.1009-13, 2001

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; SUDERA, D. K. Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol. British Journal of Pharmacology, v.90, n.3, p.601-7, 1987

ROUBENOFF, R.; HEYMSFIELD, S. B.; KEHAYIAS, J. J.; CANNON, J. G.; ROSENBERG, I. H. Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. The American Journal of Clinical Nutrition, v.66, n.1, p.192-6, 1997

ROVEDA, F.; MIDDLEKAUFF, H. R.; RONDON, M. U.; REIS, S. F.; SOUZA, M.; NASTARI, L.; BARRETTO, A. C.; KRIEGER, E. M.; NEGRAO, C. E. The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial. Journal of American College Cardiology, v.42, n.5, p.854-60, 2003. Dallas.

RUBIM, V. S.; DRUMOND NETO, C.; ROMEO, J. L.; MONTERA, M. W. [Prognostic value of the Six-Minute Walk Test in heart failure]. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v.86, n.2, p.120-5, 2006. São Paulo.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation, v.58, n.6, p.1072-83, 1978. Dallas.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell, v.117, n.3, p.399-412, 2004

SANTOS, A. C.; ALVES, M. J.; RONDON, M. U.; BARRETTO, A. C.; MIDDLEKAUFF, H. R.; NEGRAO, C. E. Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v.289, n.2, p.H593-9, 2005

SANTOS, R. A.; CASTRO, C. H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S. V.; ALMEIDA, A. P.; PAULA, R. D.; CRUZ, J. S.; RAMOS, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, v.47, n.5, p.996-1002, 2006. New York.

SCHRAMM, N. L.; MCDONALD, M. P.; LIMBIRD, L. E. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. The Journal of Neuroscience, v.21, n.13, p.4875-82, 2001

SCHULZE, P. C.; GIELEN, S.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. International Journal of Cardiology, v.85, n.1, p.141-9, 2002

SIMONINI, A.; LONG, C. S.; DUDLEY, G. A.; YUE, P.; MCELHINNY, J.; MASSIE, B. M. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. Circulation Research, v.79, n.1, p.128-36, 1996

SPURWAY, N. C. Objective characterization of cells in terms of microscopical parameters: an example from muscle histochemistry. The Histochemical Journal, v.13, n.2, p.269-317, 1981

STASSIJNS, G.; LYSSENS, R.; DECRAMER, M. Peripheral and respiratory muscles in chronic heart failure. The European Respiratory Journal, v.9, n.10, p.2161-7, 1996

STEVENS, L.; FIRINGA, C.; GOHLSCH, B.; BASTIDE, B.; MOUNIER, Y.; PETTE, D. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. American Journal of Physiology Cell physiology, v.279, n.5, p.C1558-63, 2000

SULLIVAN, M. J.; GREEN, H. J.; COBB, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. Circulation, v.81, n.2, p.518-27, 1990

SULLIVAN, M. J.; KNIGHT, J. D.; HIGGINBOTHAM, M. B.; COBB, F. R. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. Circulation, v.80, n.4, p.769-81, 1989

THOMASON, D. B.; BOOTH, F. W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. Journal of Applied Physiology, v.68, n.1, p.1-12, 1990

TIROSH, R.; DEGANI, H.; BERKE, G. Prelytic reduction of high-energy phosphates induced by antibody and complement in nucleated cells. ³¹P-NMR study. Complement, v.1, n.4, p.207-12, 1984

TOTH, M. J.; GOTTLIEB, S. S.; GORAN, M. I.; FISHER, M. L.; POEHLMAN, E. T. Daily energy expenditure in free-living heart failure patients. The American Journal of Physiology, v.272, n.3 Pt 1, p.E469-75, 1997

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Energy metabolism in heart failure. The Journal of Physiology, v.555, n.Pt 1, p.1-13, 2004

VESCOVO, G. Skeletal muscle response to exercise and treatment: another sibyl in the heart failure syndrome? International Journal of Cardiology, v.83, n.1, p.33-4, 2002

VESCOVO, G.; AMBROSIO, G. B.; DALLA LIBERA, L. Apoptosis and changes in contractile protein pattern in the skeletal muscle in heart failure. Acta Physiologica Scandinavica, v.171, n.3, p.305-10, 2001

VOLTERRANI, M.; CLARK, A. L.; LUDMAN, P. F.; SWAN, J. W.; ADAMOPOULOS, S.; PIEPOLI, M.; COATS, A. J. Predictors of exercise capacity in chronic heart failure. European Heart Journal, v.15, n.6, p.801-9, 1994

WANG, M.; YIP, G. W.; WANG, A. Y.; ZHANG, Y.; HO, P. Y.; TSE, M. K.; YU, C. M.; SANDERSON, J. E. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. Journal of Hypertension, v.23, n.1, p.183-91, 2005. Dallas.

WARREN, G. L.; HAYES, D. A.; LOWE, D. A.; WILLIAMS, J. H.; ARMSTRONG, R. B. Eccentric contraction-induced injury in normal and hindlimb-suspended mouse soleus and EDL muscles. Journal of Applied Physiology, v.77, n.3, p.1421-30, 1994

WELTMAN, A. The blood lactate response to exercise. Champaign: Human kinetics. 1995. 115 p. (Current issues in exercise science: monograph no. 4)

WERNIG, A.; IRINTCHEV, A.; WEISSHAUPT, P. Muscle injury, cross-sectional area and fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running. The Journal of Physiology, v.428, p.639-52, 1990

WIENER, D. H.; FINK, L. I.; MARIS, J.; JONES, R. A.; CHANCE, B.; WILSON, J. R. Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in patients with heart failure: role of reduced muscle blood flow. Circulation, v.73, n.6, p.1127-36, 1986

WILLIAMS, M. H.; KREIDER, R. B.; BRANCH, J. D. Creatine Requirements and Metabolic Functions. In: (Ed.). Creatine - the power supplement. Champaign: Human Kinetics, 1999. Creatine Requirements and Metabolic Functions, p.pp. 250

WILLIAMS, J. H.; BARNES, W. S. The positive inotropic effect of epinephrine on skeletal muscle: a brief review. Muscle Nerve, v.12, n.12, p.968-75, 1989

WILSON, J. R.; FINK, L.; MARIS, J.; FERRARO, N.; POWER-VANWART, J.; ELEFF, S.; CHANCE, B. Evaluation of energy metabolism in skeletal muscle of patients with heart failure with gated phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. Circulation, v.71, n.1, p.57-62, 1985

WILSON, J. R.; MANCINI, D. M.; DUNKMAN, W. B. Exertional fatigue due to skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. Circulation, v.87, n.2, p.470-5, 1993

WILSON, J. R.; MARTIN, J. L.; SCHWARTZ, D.; FERRARO, N. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of impaired nutritive flow to skeletal muscle. Circulation, v.69, n.6, p.1079-87, 1984

WINTERS, R.; MATTHEWS, R.; ERCAL, N.; KRISHNAN, K. Glutamine protects Chinese hamster ovary cells from radiation killing. Life Sciences, v.55, n.9, p.713-20, 1994

YANG, Y. T.; MCELLIGOTT, M. A. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. The Biochemical Journal, v.261, n.1, p.1-10, 1989

YIMLAMAI, T.; DODD, S. L.; BORST, S. E.; PARK, S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. Journal of Applied Physiology, v.99, n.1, p.71-80, 2005

ZELIS, R.; FLAIM, S. F. The circulations in congestive heart failure. Modern Concepts of Cardiovascular Disease, v.51, n.2, p.79-84, 1982

ANEXOS

ANEXO I – Pressão arterial, em mm Hg, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	132	116	103	107	104	115
2	128	102	94	127	116	108
3	110	113	101	110	116	107
4	108	103	99	124	133	109
5	119	108	114	114	120	126
6	123	109	118	132	113	109
7	106	110	110	115	113	105
8	102	115	112	108	118	113
9	118	113	126	110	113	109
10	108	121	117	100	118	118
11	135	119	110	123	107	124
12	98		115	117	117	
13	111		110	90		
14	112		125	96		
15	116		119	97		
16	105		112			
17	117					
18	103					
19	112					
20	94					
21	108					
22	97					
23	111					
24	103					
25	102					

26	115					
27	110					
28	92					
29	100					
30	118					
31	108					
32	94					
33	102					
Média	109,6	111,7	111,5	111,3	115,7	113,0
Desvio Padrão	10,5	6,1	9,0	12,1	7,2	7,0
Erro Padrão	1,8	1,8	2,2	3,1	2,1	1,8

ANEXO II – Frequência cardíaca, em batimentos por minuto, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	618	576	611	673	648	739
2	601	557	594	675	679	707
3	556	584	621	613	631	674
4	536	540	649	609	668	702
5	599	552	580	688	629	712
6	585	571	594	635	621	698
7	544	623	552	681	717	735
8	605	595	510	626	695	679
9	586	589	606	640	680	668
10	602	521	574	601	623	653
11	624	573	549	640	642	641
12	593		588	663	693	674
13	525		539	635		703
14	549		583	610		687
15	537		572	636		673
16	557		581	628		
17	477			605		
18	502			680		
19	504			664		
20	645			643		
21	586			669		
22	555			631		
23	512			671		
24	563					
25	545					
26	509					
27	534					

28	559					
29	563					
Média	561,0	571,0	581,4	641,7	660,5	689,7
Desvio Padrão	40,9	28,0	33,6	28,3	32,4	27,8
Erro Padrão	7,6	8,4	8,4	5,9	9,4	7,2

ANEXO III – Concentrações de noradrenalina plasmáticas, em pg/ml, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	6083	3033	6576	7695	4937	9227
2	3140	2851	7996	4312	6213	11770
3	6812	5134	6797	5076	8397	8380
4	5047	3123	4774	5754	6989	7194
5	3447	3916	5451	4155	6456	11626
6	3679	4258	3347	4341	5047	6909
7	4681	5669		6483	7025	
8	4473	4076		4658	7330	
9	6008	5217		7786	7844	
10	4702	4812		10180	9386	
11	3434	5538			4212	
12					5806	
Média	4682,2	4329,6	5823,3	6044,0	6636,8	9184,5
Desvio Padrão	1220,6	1024,0	1649,5	1985,3	1509,7	2118,1
Erro Padrão	368,0	308,7	673,4	627,8	435,8	864,7

ANEXO IV – Fração de encurtamento de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	21,6%	20,3%	22,3%	17,4%	16,5%	15,2%
2	23,5%	21,0%	21,7%	18,3%	16,5%	13,2%
3	20,9%	20,7%	24,1%	16,7%	16,4%	14,1%
4	21,7%	22,4%	17,4%	17,9%	16,6%	13,6%
5	17,3%	20,9%	18,1%	17,3%	15,6%	12,7%
6	22,1%	22,3%	21,8%	16,0%	13,4%	15,2%
7	21,7%	22,1%	22,4%	16,6%	14,0%	16,5%
8	21,9%	16,9%	23,4%	17,2%	13,4%	16,9%
9	22,2%	24,7%	22,4%	17,9%	12,3%	
10	21,2%	23,7%	22,3%	16,6%	13,3%	
11		23,8%			15,7%	
12		22,8%			16,5%	
13		25,5%			15,6%	
14		20,9%			15,1%	
15		22,1%			14,4%	
16		21,7%			14,8%	
17		22,3%			14,1%	
18		21,9%			13,0%	
19		22,3%				
20		23,5%				
Média	21,4%	22,1%	21,6%	17,2%	14,8%	14,7%
Desvio Padrão	0,016	0,018	0,022	0,007	0,014	0,015
Erro Padrão	0,005	0,004	0,007	0,002	0,003	0,005

ANEXO V – Fração de ejeção de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	50,1%	47,8%	51,5%	42,3%	40,3%	37,5%
2	53,6%	49,1%	50,5%	43,9%	40,3%	33,3%
3	48,9%	48,5%	54,9%	41,0%	40,3%	35,3%
4	50,5%	51,7%	42,2%	43,2%	40,6%	34,3%
5	42,0%	48,9%	43,7%	41,9%	38,5%	32,3%
6	51,3%	51,6%	50,9%	39,4%	33,7%	37,7%
7	50,5%	51,4%	51,7%	40,7%	35,1%	40,2%
8	51,0%	41,3%	53,7%	41,9%	33,7%	41,2%
9	51,5%	55,8%	51,8%	43,2%	31,2%	
10	49,7%	54,0%	51,6%	40,9%	33,6%	
11		54,4%			38,6%	
12		52,4%			40,3%	
13		57,0%			38,5%	
14		48,9%			37,6%	
15		51,3%			36,0%	
16		50,5%			36,9%	
17		51,5%			35,3%	
18		50,8%			32,9%	
19		51,7%				
20		53,6%				
Média	49,9%	51,1%	50,2%	41,8%	36,9%	36,5%
Desvio Padrão	0,030	0,034	0,041	0,014	0,030	0,032
Erro Padrão	0,010	0,008	0,013	0,004	0,007	0,011

ANEXO VI – Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, em cm, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	0,45	0,395	0,41	0,39	0,395	0,422
2	0,39	0,405	0,38	0,41	0,395	0,417
3	0,40	0,435	0,381	0,35	0,371	0,390
4	0,38	0,380	0,363	0,38	0,392	0,42
5	0,40	0,417	0,381	0,41	0,392	0,36
6	0,34	0,38	0,35	0,37	0,40	0,395
7	0,39	0,33	0,42	0,35	0,42	0,455
8	0,36	0,390	0,35	0,38	0,43	0,385
9	0,38	0,373	0,39	0,38	0,41	
10	0,35	0,389	0,39	0,33	0,39	
11		0,35			0,415	
12		0,42			0,395	
13		0,41			0,385	
14		0,41			0,38	
15		0,38			0,38	
16		0,38			0,398	
17		0,41			0,390	
18		0,40			0,385	
19		0,35				
20		0,392				
Média	0,38	0,39	0,38	0,38	0,40	0,41
Desvio Padrão	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,03
Erro Padrão	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01

ANEXO VII – Distância total percorrida, em metros, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	396	396	396	301	396	162
2	396	396	396	420	260	180
3	339	442	396	301	396	201
4	342	352	396	195	315	201
5	315	442	396	203	396	243
6	369	396	396	407	315	396
7	585	442	300	374	396	396
8	396	396	442	399	300	300
9	486	442	396	396	300	243
10		442	396	334	243	243
11		352	396	369	396	180
12		352	396	291	396	180
13		352	243	552	396	180
14		442	243	342	243	180
15		352	243	342	300	
16		352	243	369	243	
17				396	300	
18				456	300	
19				486	396	
20				426	396	
21				243	396	
22					243	
23					300	
Média	402,67	396,75	354,63	362,00	331,39	234,64
Desvio Padrão	84,32	40,25	71,92	88,07	61,99	77,97
Erro Padrão	28,11	10,06	17,98	19,22	12,93	20,84

ANEXO VIII – Velocidade máxima atingida, em m/min, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	27	27	24	21	27	18
2	27	27	24	21	24	18
3	21	30	24	33	27	18
4	24	27	24	24	24	18
5	24	30	27	24	27	21
6	27	27	27	24	24	27
7	33	30	24	27	27	27
8		27	30	27	24	24
9			27	30	24	21
10			27	27	21	21
11			27	21	27	18
12			27		27	18
13			21		27	18
14			21		21	18
15			21		24	
16			21		21	
17					24	
18					24	
Média	26,14	28,13	24,75	25,36	24,67	20,36
Desvio Padrão	3,76	1,55	2,79	3,88	2,20	3,37
Erro Padrão	1,42	0,55	0,70	1,17	0,52	0,90

ANEXO IX – Velocidade atingida na máxima fase estável do lactato sangüíneo, em m/min, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	15	18	12	15	12	12
2	18	12	15	18	15	12
3	18	18	12	18	12	12
4	12	15	15	12	12	12
5	15	12	15	12	15	12
6	12	12	15	15	12	12
7	15	12	15	12	12	12
8	15	15	15	15	15	12
9		15	15	15	12	12
10		15	15	15	15	12
11		12	15		12	15
12		15	15		12	
13		12			15	
14		15			15	
15		18			15	
16		15			12	
Média	15,00	14,44	14,50	14,70	13,31	12,27
Desvio Padrão	2,27	2,25	1,17	2,21	1,54	0,90
Erro Padrão	0,80	0,56	0,34	0,70	0,38	0,27

ANEXO X – Massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	21,10	27,20	34,00	25,40	29,40	31,50
2	24,00	27,90	29,40	27,00	29,00	30,90
3	22,20	28,10	29,30	24,00	27,10	30,90
4	21,40	26,10	29,70	23,20	28,50	30,90
5	28,20	29,60	31,70	26,20	28,10	29,90
6	26,10	29,00	27,50	26,50	30,50	30,50
7	28,20	26,90	30,90	26,40	29,40	28,20
8	30,30	28,30	30,80	25,00	29,70	27,70
9	25,40	29,60	27,90	28,00	28,20	29,70
10	26,10	30,50	30,00	24,90	29,00	27,30
11	28,10	26,90	26,00	24,70	29,20	26,90
12	27,00	26,60	30,30	24,40	30,40	27,20
13	26,70	24,40	31,40	23,80	30,50	28,30
14	24,30	25,00	27,30	25,70	28,60	29,70
15	22,00	26,20	30,40	25,10	26,50	30,20
16	25,70	25,20	28,20	27,00	27,40	24,00
17	28,30	23,20	27,00	25,50	28,30	24,00
18	27,60	22,80	25,40	23,80	27,30	26,80
19	22,80		26,20	19,20		26,60
20	26,60		31,50	24,40		25,30
21	28,50		26,80			26,20
22	25,90		26,50			30,30
23	28,50		26,70			27,60
24	27,00		26,40			28,10
25			27,50			26,00
26			33,90			27,40
27			33,00			27,40

28			30,50			27,40
29			29,50			26,30
30			31,00			27,00
31			30,10			29,70
32			29,70			31,30
33			33,50			27,40
34			32,30			27,80
35			31,80			26,60
36			31,60			28,50
37			32,00			29,20
38			33,80			26,00
39			33,70			27,60
40			30,20			28,10
41			27,80			26,50
42			26,70			25,30
43			32,60			27,20
44			32,70			27,90
45			30,40			25,60
46			29,50			28,50
47			27,90			31,60
48			27,70			28,20
49			27,80			30,90
50			32,00			28,00
51			28,20			31,40
52			26,70			
53			27,50			
54			28,80			
55			30,30			
Média	25,92	26,86	29,67	25,01	28,73	28,11
Desvio Padrão	2,54	2,18	2,38	1,85	1,18	1,96
Erro Padrão	0,52	0,51	0,32	0,41	0,28	0,27

ANEXO XI – Tecido adiposo retroperitoneal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	1,32	3,41	3,65	1,19	2,04	2,11
2	1,66	2,17	4,57	0,90	1,82	2,28
3	1,49	2,35	3,69	1,79	2,57	2,67
4	1,59	2,93	2,59	0,93	1,86	2,25
5	1,70	2,57	2,72	1,62	3,16	2,80
6	2,34	2,73	3,94	1,43	1,42	2,89
7	2,14	2,72	1,97	1,20	2,22	2,36
8	2,20	3,33	2,61	2,01	1,77	2,35
9	2,56	1,86	3,92	1,01	3,03	1,84
10	2,92	3,40	4,30	0,90	2,77	
11	2,95	1,68	2,06	0,96	3,31	
12	2,93	3,06	1,86	1,95	2,62	
13	2,68	3,16	2,88	2,00	3,05	
14	1,96		3,08	1,56	1,40	
15			2,34	2,39	1,85	
16			3,46	2,02	1,30	
17					1,76	
Média	2,17	2,72	3,10	1,49	2,23	2,40
Desvio Padrão	0,57	0,57	0,85	0,49	0,66	0,34
Erro Padrão	0,15	0,16	0,21	0,12	0,16	0,11

ANEXO XII – Tecido adiposo epididimal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	10,71	13,61	11,37	10,50	15,07	8,59
2	9,13	8,30	6,99	10,12	11,28	9,61
3	8,00	11,87	7,03	11,13	10,89	11,02
4	10,62	7,58	8,32	11,12	8,70	10,94
5	7,91	14,83	10,15	11,96	12,79	8,65
6	12,87	14,42	12,08	11,34	7,71	7,38
7	10,07		15,08	9,83	11,03	10,36
8	11,11		11,23	13,44	8,98	10,60
9	9,10		7,65	11,35		12,51
10	11,32		5,38	9,92		
11	11,15		5,31	10,17		
12	14,06		18,12	10,26		
13	13,34		15,02	10,77		
14			13,07	12,00		
15			9,46	8,97		
16			13,20			
17			8,98			
18			10,62			
19			16,72			
Média	10,72	11,77	10,83	10,86	10,80	9,96
Desvio Padrão	1,92	3,14	3,71	1,10	2,38	1,56
Erro Padrão	0,53	1,28	0,85	0,28	0,84	0,52

ANEXO XIII – Massa isenta de gordura e massa gorda corrigida pela massa corporal de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade.

	Massa isenta de gordura		Massa gorda	
	WT 7M	KO 7M	WT 7M	KO 7M
1	0,28	0,29	0,09	0,07
2	0,28	0,30	0,07	0,03
3	0,28	0,37	0,13	0,04
4	0,33	0,35	0,06	0,03
5	0,23	0,28	0,07	0,04
6	0,25	0,29	0,10	0,02
7	0,23	0,33	0,06	
8	0,25		0,09	
9	0,24		0,05	
Média	0,263	0,315	0,078	0,037
Desvio Padrão	0,033	0,034	0,025	0,016
Erro Padrão	0,011	0,013	0,008	0,007

ANEXO XIV – Razão peso úmido / peso seco do músculo plantar, em miligramas, corrigida pela massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	2,43	3,80	2,65	2,89	2,70	2,88
2	2,68	3,23	3,90	3,21	3,24	3,22
3	3,93	3,05	3,79	5,68	2,92	3,61
4	2,40	2,97	3,68	4,04	3,29	4,05
5	4,53	3,00	3,04	4,22	2,66	2,81
6	3,33	3,73	3,62	3,17	3,18	3,63
7	3,39		4,26	2,65	2,91	3,26
8	3,36		3,23	3,14	2,96	2,80
9			3,32	3,08	2,41	3,18
10			3,09	3,21	2,40	3,43
11			3,66	3,67	2,83	3,06
12			4,23	4,32	3,17	2,43
13			4,31	2,96		3,36
14			4,02			3,34
15			3,45			3,02
16			3,21			3,50
17			3,51			2,68
18			3,69			3,06
19			3,00			2,64
20			3,30			4,03
21			4,25			4,23
22			3,05			3,76
23			3,40			3,84
24			3,46			
25			3,31			
26			3,33			

Média	3,26	3,30	3,53	3,56	2,89	3,30
Desvio Padrão	0,74	0,38	0,44	0,83	0,30	0,49
Erro Padrão	0,26	0,15	0,09	0,23	0,09	0,10

ANEXO XV – Razão peso úmido / peso seco do músculo sóleo, em miligramas, corrigida pela massa corporal, em gramas, de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	2,94	2,86	2,33	3,46	2,09	4,54
2	2,50	2,70	2,00	3,20	2,03	3,13
3	2,60	2,60	3,59	3,92	2,58	3,29
4	4,55	3,94	3,63	4,81	2,23	3,59
5	3,26	2,73	3,17	3,00	3,07	2,73
6	5,60	1,76	3,04	3,35	2,86	3,91
7	2,87		3,57	5,13	2,66	2,53
8	3,20		4,09	4,75	2,53	2,77
9			3,83	2,61	2,68	4,53
10			3,04	4,55	3,04	1,58
11			3,03	3,83	3,00	2,73
12			3,82	3,38	3,17	3,23
13			3,65	3,31		2,17
14			3,90			3,33
15			3,00			3,60
16			3,45			3,50
17			3,48			3,60
18			4,14			
19			4,10			
20			3,07			
21			3,48			
22			2,79			
23			5,31			
24			3,64			
25			2,47			
26			2,70			

27			2,95			
28			4,11			
29			2,52			
Média	3,44	2,76	3,38	3,79	2,66	3,22
Desvio Padrão	1,08	0,70	0,68	0,79	0,39	0,77
Erro Padrão	0,38	0,29	0,13	0,22	0,11	0,19

ANEXO XVI – Frequência de locomoção e frequência de levantar em teste de campo aberto com duração de cinco minutos em camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	Locomoção				Levantar			
	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	224	143	149	175	35	37	32	40
2	211	209	121	169	34	34	48	18
3	177	229	138	154	21	31	26	30
4	176	235	116	114	44	34	26	16
5	226	166	202	150	21	37	14	31
6	217	178	154	80	26	48	28	7
7	152	145	202	187	25	20	35	7
8	200	226	188	145	45	59	24	19
9	216	226	102	119	31	37	18	20
10	137	137	119	130	23	24	26	14
11	223	152	145		31	32	13	4
12	248	234			22	47		9
Média	200,58	190,00	148,73	142,30	29,83	36,67	26,36	17,92
Desvio Padrão	33,20	40,05	35,05	32,25	8,42	10,62	9,92	11,04
Erro Padrão	9,58	11,56	10,57	10,20	2,43	3,07	2,99	3,19

ANEXO XVII – Frequência de locomoção e frequência de levantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos sete meses de idade avaliados em teste de campo aberto nos dois minutos e trinta segundos finais.

	Locomoção		Levantar	
	WT 7M	KO 7M	WT 7M	KO 7M
1	65	88	16	30
2	79	107	13	12
3	116	98	14	25
4	103	65	17	13
5	62	79	17	16
6	96	69	18	6
7	71	115	9	4
8	87	72	26	12
9	119		21	10
10	70		15	
11	68		16	
12	85		18	
Média	85,08	86,63	16,67	14,22
Desvio Padrão	19,64	18,52	4,19	8,44
Erro Padrão	5,67	6,55	1,21	2,81

ANEXO XVIII – Latência de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade avaliados em teste de campo aberto.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	3	2	19	8
2	10	4	11	71
3	7	3	16	8
4	4	4	24	60
5	6	2	22	10
6	7	6	26	45
7	9	7	13	38
8	3	6	24	9
9	13	4	50	125
10	2	4	33	
11	9	4	52	
12	6	3		
Média	6,58	4,08	26,36	41,56
Desvio Padrão	3,29	1,56	13,66	39,53
Erro Padrão	0,95	0,45	4,12	13,18

ANEXO XIX – Atividade máxima da enzima hexoquinase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos controle (WT) aos três e sete meses de idade.

	Sóleo		Porção Vermelha		Porção Branca	
	WT 3M	WT 7M	WT 3M	WT 7M	WT 3M	WT 7M
1	58,24	47,39	26,69	13,00	24,63	21,84
2	45,93	29,59	26,47	42,52	18,96	21,08
3	68,94	67,42	32,67	37,10	24,69	19,29
4	65,37	14,21	35,47	10,43	21,87	25,45
5	52,10	12,70	38,66	10,57	23,46	14,47
6	38,80	14,14	36,14	7,04	23,44	28,09
7	41,73	55,28	23,64	15,84	21,01	26,01
8	45,28	60,53	27,27	18,41	24,23	24,47
9	71,27	32,99	44,41	29,80	21,64	14,47
10	34,57	55,28	26,48	27,30	27,26	
11				15,84	24,08	
12				20,94		
13				40,85		
Média	52,22	38,95	31,79	22,28	23,21	21,68
Desvio Padrão	13,09	20,87	6,74	12,08	2,23	4,90
Erro Padrão	4,14	6,60	2,13	3,35	0,67	1,63

ANEXO XX – Atividade máxima da enzima hexoquinase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	Sóleo		Porção Vermelha		Porção Branca	
	KO 3M	KO 7M	KO 3M	KO 7M	KO 3M	KO 7M
1	43,13	49,09	34,02	18,81	21,37	18,07
2	38,83	27,42	20,39	46,27	23,17	17,69
3	22,01	19,45	27,21	11,33	29,59	21,78
4	101,06	32,54	32,81	10,40	28,30	22,04
5	70,46	42,38	45,44	10,70	41,79	27,08
6	63,95	41,95	52,11	22,04	36,85	32,89
7	78,95	56,49	36,17	46,86	20,60	34,97
8		27,24		37,64		22,04
9		42,38		27,92		
10				22,04		
Média	59,77	37,66	35,45	25,40	28,81	24,57
Desvio Padrão	26,91	11,83	10,66	13,97	8,05	6,48
Erro Padrão	10,17	3,94	4,03	4,42	3,04	2,29

ANEXO XXI – Atividade máxima da enzima citrato sintase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos controle (WT) aos três e sete meses de idade.

	Sóleo		Porção Vermelha		Porção Branca	
	WT 3M	WT 7M	WT 3M	WT 7M	WT 3M	WT 7M
1	715,87	575,85	184,84	240,21	108,70	175,64
2	733,38	416,82	186,96	331,79	95,95	95,65
3	603,05	444,37	145,20	320,51	75,01	199,66
4	426,63	239,79	422,15	181,08	113,54	106,33
5	300,96	235,80	220,59	307,38	91,13	154,10
6	429,41	297,74	177,27	244,31	102,32	94,75
7	433,80	851,56	216,60	205,59	108,18	122,91
8	423,00	731,00	149,60	186,35	116,01	107,69
9	404,79	532,39	197,37	230,44	120,78	126,85
10	275,74		206,12	205,88	139,15	86,43
11			182,72	285,65	105,47	69,34
12				387,94		47,36
13				168,25		
Média	474,66	480,59	208,13	253,49	106,93	115,56
Desvio Padrão	158,09	214,71	74,92	67,71	16,65	43,65
Erro Padrão	49,99	71,57	22,59	18,78	5,02	12,60

ANEXO XXII – Atividade máxima da enzima citrato sintase, em nmol / min x proteína, nos músculos sóleo, porção vermelha do gastrocnêmio e porção branca do gastrocnêmio de camundongos com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	Sóleo		Porção Vermelha		Porção Branca	
	KO 3M	KO 7M	KO 3M	KO 7M	KO 3M	KO 7M
1	780,13	376,20	275,55	166,15	177,35	175,79
2	745,84	111,66	217,39	298,35	176,09	138,04
3	479,76	244,69	262,44	217,11	204,80	120,74
4	432,17	352,24	98,20	183,36	130,78	110,83
5	312,36	221,60	141,94	173,53	123,12	124,20
6	283,44	227,60	221,65	242,83	113,03	101,72
7	265,42	399,35	173,87	240,50		123,63
8		370,36		187,06		126,01
9		362,75		262,58		114,29
10				238,62		139,24
Média	471,30	296,27	198,72	221,01	154,19	127,45
Desvio Padrão	214,20	98,16	64,27	43,11	36,84	20,47
Erro Padrão	80,96	32,72	24,29	13,63	15,04	6,47

ANEXO XXIII – Percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	29,43	36,38	45,81	28,16	32,19	31,25
2	35,15	36,04	36,18	34,56	32,87	31,71
3	30,24	33,66	31,76	29,55	34,09	30,56
4	38,13	38,20	36,22	36,07	29,95	33,19
5	38,30	32,23	38,08	32,85	32,74	30,41
6	30,72	36,11	34,07	29,91	33,93	29,53
7	29,95	34,09	33,81	32,33	32,17	
8	33,33	30,97	32,31	40,14	28,85	
9		31,30	31,75	28,90		
10				31,85		
Média	33,16	34,33	35,56	32,43	32,10	31,11
Desvio Padrão	3,66	2,52	4,43	3,70	1,83	1,26
Erro Padrão	1,29	0,84	1,48	1,17	0,65	0,52

ANEXO XXIV – Percentual de fibras do tipo IIA no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	69,15	58,26	62,99	69,75	66,34	68,33
2	61,77	60,66	66,09	64,37	65,18	66,85
3	66,66	63,41	62,50	69,41	62,73	67,50
4	59,39	60,11	59,41	62,02	61,77	65,65
5	60,56	63,51	64,07	64,62	67,38	67,54
6	68,41	60,00	64,33	68,91	66,67	68,39
7	69,35	62,66	61,54	64,66	65,84	
8	66,13	65,49	64,31	59,14	64,19	
9		64,71		70,18	69,62	
10				66,45		
Média	65,18	62,09	63,16	65,95	65,52	67,38
Desvio Padrão	4,02	2,44	2,04	3,67	2,40	1,02
Erro Padrão	1,42	0,81	0,72	1,16	0,80	0,42

ANEXO XXV – Percentual de fibras do tipo IIA no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	44,99	34,02	35,98	25,44
2	40,67	36,09	30,65	34,91
3	42,50	45,12	33,01	39,77
4	38,71	45,53	33,15	36,67
5		33,46		37,59
6		40,46		
7		36,51		
8		33,13		
Média	41,72	38,04	33,20	34,88
Desvio Padrão	2,67	5,06	2,18	5,56
Erro Padrão	1,34	1,79	1,09	2,49

ANEXO XXVI – Percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	50,14	57,60	56,08	56,52
2	53,39	47,86	62,72	54,83
3	52,14	48,90	58,30	51,54
4	54,84	59,97	56,74	57,14
5		53,61		55,15
6		55,82		
Média	52,63	53,96	58,46	55,04
Desvio Padrão	1,99	4,81	2,99	2,17
Erro Padrão	0,99	1,97	1,50	0,97

ANEXO XXVII – Área de secção transversa das fibras do tipo I, em μm^2 , no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	1504835,4	1741182,9	1252397,1	1078337,6	1469835,7	1224477,3
2	1458637,1	1490417,0	1330499,7	1299538,4	1105309,5	1216898,8
3	1302956,0	1331846,1	1547774,0	1662188,0	1433839,2	1082533,9
4	987731,9	1230053,3	1476387,1	1316345,4	1419764,6	1187494,1
5	1220116,8	1150458,2	1337324,6	1441888,2	1143810,3	1037133,5
6	1277288,1	1228570,4	1343979,8	1144933,1	1260945,6	1066061,0
7	1500734,2	1271515,1	1534142,2	1057427,8	1264127,0	
8	920216,5	1383436,1	1252772,1	1077622,5	1241006,6	
9			1478038,1	1188169,2	1190268,0	
10			1270149,8	1084986,7		
Média	1271564,5	1353434,9	1382346,4	1235143,7	1280989,6	1135766,4
Desvio Padrão	223479,5	188680,9	115883,2	197125,5	131568,0	83125,0
Erro Padrão	79011,9	66708,8	36645,5	62336,6	43856,0	33935,6

ANEXO XXVIII – Área de secção transversa das fibras do tipo IIA, em μm^2 , no músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	934086,0	1473256,0	630915,0	643010,0	948974,0	675382,0
2	1152367,0	1103422,0	1280348,0	839911,0	964466,0	675382,0
3	772445,0	824157,0	1651199,0	925254,0	907538,0	671683,0
4	1197947,0	767772,0	776798,0	719995,0	873273,0	786738,0
5	796084,0	705121,0	776710,0	689315,0	639262,0	568434,0
6	1094634,0	564224,0	794457,0	718930,0	808159,0	790156,0
7	1116144,0	1254200,0	617220,0	842629,0	1027056,0	581.844
8	694349,0	970364,0	1194946,0	738270,0	608399,0	
9		826.174	984360,0	784765,0		
10			675382,0	842868,0		
Média	969757,0	943187,8	938233,5	774494,7	847140,9	678517,0
Desvio Padrão	195907,0	287887,8	338755,8	87142,3	152393,4	87278,6
Erro Padrão	69263,6	95962,6	107124,0	27556,8	53879,2	32988,2

ANEXO XXIX – Área de secção transversa das fibras do tipo IIA, em μm^2 , no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	1906263,2	1877994,8	2328206,2	1825764,1
2	1993074,6	1865090,5	2683578,1	1830404,2
3	1679033,6	1954483,9	2367074,9	1905459,6
4	1858519,0	1884394,8	2242984,2	1827187,9
5		1847806,6		1720193,4
6		1925144,1		
7		2088730,4		
8		1710229,2		
Média	1859222,59	1894234,29	2405460,84	1821801,85
Desvio Padrão	132410,64	106661,99	192518,10	66033,32
Erro Padrão	66205,32	37710,71	96259,05	29531,00

ANEXO XXX – Área de secção transversa das fibras do tipo IIB, em μm^2 , no músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	932632,05	997207,06	1068857,64	772857,41
2	964862,68	931793,67	1284837,20	878999,31
3	919604,09	1090112,79	1077839,13	863848,24
4	921466,68	966376,00	1131656,25	870003,04
5		1011821,09		840473,51
6		816744,14		
7		1060158,32		
8		912131,99		
Média	934641,37	973293,13	1140797,55	845236,30
Desvio Padrão	20952,78	87232,86	99950,15	42898,50
Erro Padrão	10476,39	30841,47	49975,07	19184,79

ANEXO XXXI – Área de secção transversa do músculo plantar, em μm^2 , de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	27932,3	23614,2	30710,0	28614,1	31953,8	25596,7
2	27410,3	29231,6	26400,4	28193,5	31337,3	26943,3
3	28666,1	28631,0	32854,8	33816,6	28379,4	26984,3
4	27928,7	39226,5	26407,2	39207,4	27755,4	25983,6
5	28150,7	28913,2	30339,9	34257,5	31414,1	24726,4
6	27252,4	29335,6	30175,1	28576,0		24563,2
Média	27890,1	29825,3	29481,2	32110,8	30168,0	25799,6
Desvio Padrão	511,9	5095,3	2571,0	4426,0	1944,8	1045,7
Erro Padrão	209,0	2080,2	1049,6	1806,9	869,7	426,9

ANEXO XXXII – Razão capilar por fibra do músculo sóleo de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três, cinco e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 5M	WT 7M	KO 3M	KO 5M	KO 7M
1	1,80	1,50	2,17	1,58	1,61	1,94
2	2,11	1,88	2,22	1,88	1,91	1,91
3	2,08	1,83	1,91	2,19	1,98	1,72
4	1,94	1,84	2,12		2,06	1,55
5	2,15	1,72	2,35		1,97	1,85
6		1,67	1,85		1,81	1,95
7		1,52			1,55	1,55
8		2,04				
9		2,07				
Média	2,01	1,79	2,10	1,89	1,84	1,78
Desvio Padrão	0,15	0,20	0,19	0,31	0,19	0,18
Erro Padrão	0,07	0,07	0,08	0,18	0,07	0,07

ANEXO XXXIII – Razão capilar por fibra do músculo plantar de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A} / α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	1,54	1,41	1,71	1,72
2	1,41	1,43	1,14	1,76
3	1,81	1,80	1,47	1,56
4	1,82	1,57	1,56	1,22
5	1,65	2,02		1,51
6	2,05	1,48		1,26
7	2,00	1,87		1,39
8		1,86		
Média	1,76	1,68	1,47	1,49
Desvio Padrão	0,23	0,23	0,24	0,21
Erro Padrão	0,09	0,08	0,12	0,08

ANEXO XXXIV – Razão capilar por fibra na porção branco do músculo gastrocnêmio de camundongos controle (WT) e com deleção dos receptores α_{2A}/α_{2C} adrenérgicos (KO) aos três e sete meses de idade.

	WT 3M	WT 7M	KO 3M	KO 7M
1	1,38	1,54	1,58	1,58
2	1,37	1,75	1,05	1,53
3	1,60	1,63	1,38	1,16
4	1,60	1,61	1,23	1,50
5	1,31	1,64	1,28	1,54
6	1,43	1,54		1,31
7	1,71	1,73		1,32
8				1,58
Média	1,48	1,63	1,30	1,44
Desvio Padrão	0,15	0,08	0,19	0,16
Erro Padrão	0,06	0,03	0,08	0,06