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

**Papel dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações
musculoesqueléticas desencadeadas pela insuficiência cardíaca**

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI

SÃO PAULO

2012

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI

**Papel dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações musculoesqueléticas
desencadeadas pela insuficiência cardíaca**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

SÃO PAULO

2012

Nome: VOLTARELLI, Vanessa Azevedo

Título: Papel dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações musculoesqueléticas desencadeadas pela insuficiência cardíaca

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Profa. Dra.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Profa. Dra.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Brum, por acreditar em meu potencial, pela enorme contribuição no meu amadurecimento científico, pela dedicação e atenção despendidas ao meu trabalho e também por ser uma orientadora amiga e compreensiva.

Aos meus pais Silvio e Elizabeth, pessoas essenciais na minha vida, que me apoiaram e que me deram suporte emocional para enfrentar as dificuldades que encontrei durante esses três anos de mestrado. Sem a ajuda, a presença, o carinho e o amor deles acredito que eu não teria conseguido chegar aonde cheguei.

Ao meu irmão Fabrício, pela preocupação e carinho que tem por mim, pela torcida para que eu tenha sucesso na minha carreira acadêmica, pelo exemplo profissional que é, por me ajudar em todos os momentos e pelas oportunidades de aprendizado e crescimento profissional que me proporcionou.

Ao meu namorado, amigo, companheiro e colega de trabalho Luiz Bechara, pelo amor, carinho, atenção, preocupação e apoio emocional e profissional, pelas horas de sono, feriados e fins de semana que deixou de lado para me ajudar e por ter colaborado diretamente para o meu amadurecimento pessoal, profissional e científico.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Alê, Aline, Andréa, Bianco, Bozi, Carmão, Chris, Dani, Paulo, Fabi, Telma, Juliane, Julio, Kátia, Max e Nathalie, pela amizade maravilhosa, pela colaboração e ajuda, pelos momentos divertidos que passamos juntos, no laboratório ou fora dele e por tornarem o meu ambiente de trabalho agradável e prazeroso.

Aos técnicos, Alex, Glória, Katt, Luciano, Marcele e Ney, pela colaboração e ajuda essenciais ao desenvolvimento do meu estudo.

Aos professores Paulo Ramires e Edilamar Menezes de Oliveira e seus respectivos alunos, pela convivência, colaboração e aprendizado científico.

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, em especial aos secretários Márcio, Ilza e Paulo, por darem o suporte necessário aos alunos de pós-graduação e pela paciência com as entregas de documentos e questionamentos afobados em prazos apertados.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

VOLTARELLI, V.A. **Papel dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações musculoesqueléticas desencadeadas pela insuficiência cardíaca.** 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa que envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-hormonais, acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade, e caracterizada por sintomas clínicos como fadiga, dispneia, e intolerância aos esforços físicos. Embora a IC seja uma síndrome de origem cardíaca, observam-se alterações em outros tecidos, como na musculatura esquelética. As modificações do fenótipo muscular e a perda de massa muscular esquelética observadas na IC contribuem para o mau prognóstico e para o aumento da mortalidade dos pacientes. Considerando que os receptores β_2 -adrenérgicos medeiam a atividade do sistema nervoso simpático na musculatura esquelética, e que a hiperatividade simpática é um dos principais componentes envolvidos no desenvolvimento da miopatia esquelética observada IC, sugere-se que estes receptores estejam associados às alterações morfofuncionais da musculatura esquelética na síndrome. Na presente Dissertação, avaliamos a contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações metabólicas e morfofuncionais da musculatura esquelética e na intolerância aos esforços físicos decorrentes da IC. Para isso, utilizamos camundongos da linhagem FVB controles e com inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 KO) que foram submetidos à cirurgia de infarto ou à cirurgia fictícia (sham). O infarto induziu disfunção e remodelamento cardíacos nos animais controles, acompanhados de aumento nos níveis de noradrenalina e adrenalina circulantes, intolerância ao esforço físico, mudança na tipagem de fibras musculares e rarefação capilar nos músculos sóleo e plantar. Essas mesmas respostas foram observadas nos animais com inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos após o infarto do miocárdio, no entanto, os animais β_2 KO infartados apresentaram uma maior redução da tolerância ao esforço físico e um quadro mais grave de miopatia esquelética.

Acompanhando essa atrofia muscular esquelética presente nos animais β_2 KO infartados, foi observado aumento da expressão de proteínas relacionadas ao sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma, aumento da atividade do 26S-proteassoma e tendência a diminuição na expressão proteica de p-Akt (ser473), p-4E-BP1 (thr37/46) e p-FoxO3 (ser253). Os resultados sugerem que a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos agrava e/ou antecipa as alterações musculoesqueléticas observadas na insuficiência cardíaca, principalmente a atrofia muscular, e que a ativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma e a inibição da síntese proteica por meio da via Akt/4E-BP1 parecem colaborar para estas respostas.

Palavras-chave: insuficiência cardíaca, músculo esquelético, receptores β_2 -adrenérgicos.

ABSTRACT

VOLTARELLI, V.A. **Role of β_2 -adrenergic receptors on skeletal muscle alterations induced by heart failure.** 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Heart failure (HF) is a complex syndrome involving multiple systems and neurohumoral compensatory mechanisms accompanied by high morbidity and mortality, and it is characterized by clinical signs like fatigue, dyspnea, and increased exercise intolerance. Although HF is a syndrome of cardiac origin, it promotes changes in other tissues, such as skeletal muscle, where modifications of muscle phenotype and the loss of skeletal muscle mass observed in HF contribute to poor prognosis and increased mortality of patients. Taking into consideration that β_2 -adrenoceptors mediate the activity of sympathetic nervous system in skeletal muscle and that sympathetic hyperactivity is one of the main components involved in developing skeletal muscle abnormalities in HF, it has been suggested that β_2 -adrenoceptors would be associated with morphofunctional alterations due to chronic sympathetic hyperactivity in skeletal muscles in HF. In the present study, we evaluated the contribution of β_2 -adrenoceptors on metabolic and morphofunctional alterations in skeletal muscle and also on exercise intolerance-induced by HF. For this, we used FVB mice and mice lacking β_2 -adrenoceptors (β_2 KO) that were submitted to myocardial infarction or sham surgery. Myocardial infarction induced cardiac dysfunction and remodeling in FVB mice, which was accompanied by significantly increased plasma levels of norepinephrine and epinephrine, exercise intolerance, changes in muscle fiber type and vascular rarefaction in both soleus and plantaris muscles. These same responses were observed in mice lacking β_2 -adrenoceptors submitted to myocardial infarction. However, infarcted β_2 KO mice presented a higher decrease of exercise tolerance and more severe skeletal myopathy. Accompanying the skeletal muscle atrophy of infarcted β_2 KO mice, it was observed a significantly increased protein expression of proteins related with the ubiquitin-proteasome system, an increased 26S-proteasome activity and a trend toward decreased protein expression of p-Akt (ser473), p-4E-BP1 (thr37/46) and p-

FoxO3a (ser253). These results suggest that the lack of β_2 -adrenoceptors worsens and/or anticipates the skeletal muscle alterations observed in HF, mainly muscular atrophy, and the activation of ubiquitin-proteasome system and inhibition of protein synthesis by Akt/4E-BP1 pathway seem to play an important role in skeletal muscle myopathy.

Key-words: heart failure, skeletal muscle, β_2 -adrenoceptors.

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>FIGURA 1 A via de sinalização β-adrenérgica envolve o receptor, a proteína G e a adenilil ciclase ligada à membrana celular. Adaptado de LYNCH & RYALL (2008).....</p>	38
<p>FIGURA 2 Principais vias de sinalização celular desencadeadas pela ativação dos receptores β_2-adrenérgicos, relacionadas com a estrutura e função musculares.....</p>	43
<p>FIGURA 3 Distância percorrida em metros pelos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF nos testes de tolerância ao esforço físico realizados aos 30, 45, 75 e 90 dias após as cirurgias de infarto e sham. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média. Para a análise dos dados foi utilizada ANOVA de dois caminhos para medidas repetidas com <i>post-hoc</i> de Duncan, assumindo nível de significância de $p \leq 0,05$, sendo @ vs. 30 dias do mesmo grupo, \$ vs. 75 dias do mesmo grupo, † vs. SHAM do mesmo genótipo aos 90 dias e & igual a KO SHAM vs. CO SHAM em todos os tempos.....</p>	49
<p>FIGURA 4 Disposição dos músculos sóleo e plantar, nos diferentes pHs: 10,3 (A) e 4,6 (B) de um camundongo controle.....</p>	57

FIGURA 5	Capilarização em diferentes músculos: sóleo (A), plantar (B) e porção branca do gastrocnêmio (C) em camundongo controle.....	59
FIGURA 6	Número de mortes de animais CO e KO durante e após as cirurgias de infarto e sham, e número de animais sobreviventes aos 90 dias pós-cirurgias.....	61
FIGURA 7	Quantificação da área de infarto dos grupos CO SHAM (14), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (12) aos 90 dias pós-infarto (A). Cortes histológicos de corações SHAM (B) e de corações INF (C) independente do genótipo. As setas indicam a área infartada. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM e # vs. KO SHAM.....	64
FIGURA 8	Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de repouso dos grupos CO SHAM (6), CO INF (7), KO SHAM (7) e KO (7) INF 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$	65
FIGURA 9	Concentração plasmática de noradrenalina e adrenalina dos grupos CO SHAM (10), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (9 em A e 8 em B) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM e # vs. KO SHAM.....	66

FIGURA 10	Distância percorrida em metros 90 dias após as cirurgias pelos grupos CO SHAM (14), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (12). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.....	69
FIGURA 11	Tempo em segundos atingido no teste Rota Rod (A) e comprimento da passada corrigida pelo comprimento naso-anal (B) 90 dias após as cirurgias pelos grupos CO SHAM (10), CO INF (9 em A e 11 em B), KO SHAM (12) e KO INF (11). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.....	71
FIGURA 12	Concentração da glicose plasmática (A) e conteúdo de glicogênio muscular (B) 90 dias após as cirurgias dos grupos CO SHAM (9), CO INF (10 em A e 8 em B), KO SHAM (12 em A e 9 em B) e KO INF (10 em A e 8 em B). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.....	72

FIGURA 13	Distribuição das fibras do tipo I, tipo IIA, tipo IIB e intermediárias, nos músculos plantar (A) e sóleo (B) dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF. As significâncias encontram-se acima das barras de erro..	74
FIGURA 14	Razão do número de capilares por número de fibras musculares nos músculos plantar (A) e sóleo (B) dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.....	75
FIGURA 15	Área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (A), tipo IIA (B), intermediárias (C) e tipo IIB (D) no músculo plantar, e das fibras do tipo I (E), tipo IIA (F), intermediárias (G) no músculo sóleo dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM, + vs. CO INF e \$ vs. KO SHAM, CO INF e CO SHAM.....	77

FIGURA 16	Expressão das proteínas Akt1 (A), p-Akt ser473 (B), p70S6K (C), 4E-BP1 (D), p-4E-BP1 thr70 (E) e p-4E-BP1 thr37/46 (F) no músculo plantar dos grupos CO SHAM (8), CO INF (7), KO SHAM (8) e KO INF (8) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo + vs. CO INF.....	80
FIGURA 17	Expressão proteica de FoxO3a (A), p-FoxO3a ser253 (B), atrogin-1 (C), MuRF-1 (D), proteínas poliubiquitinadas (Poli-Ub) (E) e atividade do 26S-proteassoma no sítio da quimiotripsina (F) no músculo plantar dos grupos CO SHAM (8), CO INF (7), KO SHAM (8) e KO INF (8) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.....	82
FIGURA 18	Esquema das possíveis proteínas envolvidas na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca na ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos..	109

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Organização dos grupos e número de animais estudados.....	62
TABELA 2	Parâmetros ecocardiográficos.....	63
TABELA 3	Massas teciduais.....	68

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Desenho experimental do estudo.....	48
QUADRO 2 Resumo dos principais resultados obtidos no estudo..	84

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	adenilil ciclase
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon Ca ²⁺
CO	Camundongos do grupo controle
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC	Débito cardíaco
DDFVE	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
E1	Proteína ativadora
E2	Proteína carreadora
E3	Proteína ligase
FC	Frequência cardíaca
FEnc	Fração de encurtamento
FoxO	Fatores de transcrição <i>forkhead Box O</i>
GPCR	Receptor acoplado à proteína G

GSK3 β	Glicogênio sintase quinase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IC	Insuficiência cardíaca
IGF-I	Fator de crescimento similar à insulina
IL 1 β	Interleucina 1 β
IM	Infarto do miocárdio
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NAPDH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
PAS	Pressão arterial sistólica
PKA	Proteína quinase A
PPVED	Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPVES	Parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
SERCA	Proteína sarco-endo retículo Ca ²⁺ -ATPase
Sham	Cirurgia fictícia
SIVD	Espessura do septo interventricular na diástole
SIVS	Espessura do septo interventricular na sístole
SUP	Sistema ubiquitina-proteassoma
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético

$\text{TNF}\alpha$	Fator de necrose tumoral α
VE	Ventrículo esquerdo
VO_2 pico	Consumo pico de oxigênio
β	Beta
$\beta_2\text{KO}$	Animais com inativação gênica dos receptores β_2 adrenérgicos

Unidades

mmHg	Milímetros de mercúrio
Bpm	Batimento por minuto
L	Litro
μL	Microlitro
m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
μm	Micrometro (10^{-6})
min	Minuto
ms	Milissegundo
g	Gramma
mg	Miligramma

μg Micrograma

mM Milimolar

μM Micromolar

LISTA DE ANEXOS

Página

ANEXO I	Parâmetros ecocardiográficos. Fração de encurtamento (FEnc) (%), diâmetro sistólico (DSFVE) e diastólico (DDFVE) finais do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular ao final da sístole (SIVS) e diástole (SIVD), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES) e diástole (PPVED) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF, expressos em mm.....	132
ANEXO II	Área de infarto (%) dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	133
ANEXO III	Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM, KO INF..	134
ANEXO IV	Concentrações plasmáticas (pg/mL) de noradrenalina e adrenalina dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	135
ANEXO V	Massas teciduais corrigidas pela massa corporal (mg/g) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	136
ANEXO VI	Distância percorrida (m) pelos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	137

ANEXO VII	Desempenho atingido nos testes Rota Rod (segundos) e deambulação (comprimento da passada corrigida pelo comprimento naso-anal) pelos animais dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	138
ANEXO VIII	Concentração de glicose plasmática (mg/dL) e conteúdo de glicogênio muscular (µg/g) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.....	139

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ANEXOS

1	INTRODUÇÃO.....	28
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1	Epidemiologia e fisiopatologia da insuficiência cardíaca.....	30
2.2	Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca.....	31
2.3	Atrofia muscular esquelética na insuficiência cardíaca.....	33
2.4	Sistema nervoso simpático e receptores β -adrenérgicos.....	36
2.5	Receptores β -adrenérgicos e músculo esquelético.....	38

2.6	Sinalização β -adrenérgica no músculo esquelético.....	41
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Gerais.....	45
3.2	Específicos.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	Amostra.....	47
4.2	Desenho experimental.....	47
4.3	Controle ponderal da massa corporal.....	49
4.4	Registro indireto da pressão arterial caudal e frequência cardíaca em repouso.....	49
4.5	Avaliação funcional da musculatura esquelética.....	50
4.6	Quantificação da área de infarto.....	51
4.7	Teste de tolerância ao esforço.....	51
4.8	Modelo experimental de insuficiência cardíaca por infarto do miocárdio em camundongos.....	52
4.9	Avaliação da função ventricular.....	53
4.10	Sacrifício e coleta de tecidos.....	54
4.11	Razão peso úmido/seco do músculo esquelético e do pulmão.....	54

4.12	Massa dos depósitos de gordura branca retroperitoneal e periepididimal.....	55
4.13	Quantificação do conteúdo de glicogênio muscular.....	55
4.14	Determinação da Concentração Plasmática de Glicose.....	55
4.15	Concentração Plasmática das Catecolaminas.....	56
4.16	Avaliação da Caracterização Histoquímica do Músculo Esquelético pela Reação Histoquímica para Miosina ATPase.....	56
4.16.1	Distribuição de fibras musculares.....	58
4.16.2	Determinação da área de secção transversa.....	58
4.16.3	Análise da razão capilar por fibra muscular.....	58
4.17	Western Blotting.....	59
4.18	Atividade Proteassomal.....	60
4.19	Análise estatística.....	60
5.	RESULTADOS.....	61
5.1	Avaliação da função ventricular.....	62
5.2	Quantificação da área de infarto.....	63
5.3	Pressão arterial e frequência cardíaca.....	65
5.4	Noradrenalina e adrenalina plasmáticas.....	65

5.5	Massas teciduais.....	66
5.5.1	Massa corporal.....	66
5.5.2	Massa do coração, massa do pulmão úmido e razão massa úmida/massa seca do pulmão.....	66
5.5.3	Massa dos músculos sóleo e plantar e razão massa úmida/massa seca do músculo tibial anterior.....	67
5.5.4	Massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal.....	67
5.6	Tolerância à realização de esforço físico.....	69
5.7	Avaliação <i>in vivo</i> da função muscular esquelética.....	70
5.7.1	Rota Rod.....	70
5.7.2	Deambulação.....	70
5.8	Glicose plasmática e conteúdo de glicogênio muscular esquelético....	71
5.9	Caracterização fenotípica da musculatura esquelética.....	72
5.9.1	Distribuição das fibras musculares.....	72
5.9.2	Capilarização.....	75
5.9.3	Área de secção transversa das fibras musculares.....	75
5.10	Caracterização das vias de sinalização envolvidas na síntese e na degradação proteica.....	78

5.11	Via de sinalização Akt/mTOR.....	78
5.12	Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma.....	81
6	DISCUSSÃO.....	85
6.1	Caracterização fenotípica do modelo de infarto do miocárdio.....	85
6.1.1	Medidas ecocardiográficas e massa cardíaca.....	85
6.1.2	Área de infarto.....	87
6.1.3	Noradrenalina e adrenalina circulantes.....	88
6.1.4	Razão massa úmida/massa seca do pulmão.....	89
6.1.5	Parâmetros hemodinâmicos.....	90
6.2	Composição corporal.....	92
6.3	Parâmetros metabólicos.....	93
6.4	Testes de desempenho físico.....	94
6.4.1	Tolerância ao esforço físico.....	95
6.4.2	Rota Rod e deambulação.....	97
6.5	Caracterização do fenótipo muscular esquelético.....	98
6.5.1	Tipagem de fibras musculares esqueléticas.....	98
6.5.2	Capilarização.....	99

6.5.3	Área de secção transversa das fibras musculares.....	100
6.6	Caracterização das vias de sinalização celular envolvidas na síntese e degradação proteica na musculatura esquelética.....	103
7	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) não é mais considerada uma doença cardíaca isolada, mas sim uma síndrome complexa que envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-humorais, acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade, e caracterizada por alguns sintomas clínicos como fadiga, dispneia, e intolerância aos esforços físicos (LUNDE et al., 2001; CRIMI et al., 2009), os quais reduzem consideravelmente a autonomia e qualidade de vida destes pacientes (WILSON et al., 1999; MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006)

Dentre as principais etiologias da IC destaca-se a etiologia isquêmica caracterizada pelo suprimento insuficiente de sangue ao músculo cardíaco, causando elevação da pressão de enchimento ventricular, morte do tecido e disfunção cardíaca severa (HEART FAILURE SOCIETY OF, 2006; ZANNAD et al., 2008) como a observada no infarto do miocárdio (IM). De fato, o IM pode repercutir sistemicamente em vários tecidos do organismo, como a musculatura esquelética (SIMKO e SIMKO, 1996; GORDON e VOIPIO-PULKKI, 1997), promovendo alterações morfofuncionais importantes neste tecido e agravando o prognóstico da IC, uma vez que estas alterações periféricas apresentam maior correlação com a capacidade funcional dos pacientes nesta síndrome (CLARK, POOLE-WILSON e COATS, 1996; HARRINGTON et al., 1997; VENTURA-CLAPIER, GARNIER e VEKSLER, 2004; MIDDLEKAUFF, 2010).

Algumas alterações morfofuncionais da musculatura esquelética associadas à IC já são bem conhecidas, como rarefação capilar, redução da densidade mitocondrial, diminuição da atividade de enzimas oxidativas, predomínio das fibras musculares do tipo II (brancas/rápidas/glicolíticas) em relação às do tipo I (vermelhas/lentas/oxidativas), e atrofia muscular (DREXLER et al., 1992; MIDDLEKAUFF, 2010)

Entre as alterações morfofuncionais observadas na IC, destaca-se a atrofia muscular, que é caracterizada por diminuição no conteúdo proteico, redução no diâmetro das fibras musculares, redução da força muscular e menor resistência à fadiga (JACKMAN e KANDARIAN, 2004), podendo, em casos mais graves, culminar

em caquexia (SCHULZE et al., 2002; MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006) definida atualmente como uma síndrome metabólica complexa associada a doenças sistêmicas e caracterizada por perda acentuada de peso e massa muscular, com ou sem perda de massa adiposa (LENK, SCHULER e ADAMS, 2010). Em muitos casos, a caquexia torna-se fator determinante para o óbito dos pacientes com IC, sendo considerada um preditor independente de mortalidade na síndrome (ANKER et al., 1997).

De uma maneira geral, a atrofia muscular é resultante de um desequilíbrio entre os sistemas de síntese e degradação proteica que culminam no catabolismo proteico, onde o sistema ubiquitina-proteassoma é considerado o principal sistema proteolítico envolvido neste quadro catabólico (TISDALE, 2005; VENTADOUR e ATTAIX, 2006), uma vez que esse sistema é responsável por clivar cerca de 90% das proteínas citosólicas (SOLOMON e GOLDBERG, 1996).

Atualmente, sabe-se que os receptores β_2 -adrenérgicos assumem papel fundamental na regulação da massa muscular esquelética tanto em situações anabólicas quanto em situações catabólicas (SATO et al., 2011), uma vez que estes receptores estão envolvidos na ativação das vias intracelulares relacionadas com a síntese proteica, bem como na inibição das vias intracelulares relacionadas à degradação proteica (NAVEGANTES, MIGLIORINI e DO CARMO KETTELHUT, 2002; LYNCH e RYALL, 2008).

No entanto, a participação da sinalização mediada pelos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações morfofuncionais observadas na IC ainda não é conhecida. Considerando que os receptores β_2 -adrenérgicos medeiam a atividade do sistema nervoso simpático na musculatura esquelética, e que a hiperatividade simpática é um dos principais componentes envolvidos no desenvolvimento da miopatia esquelética observada na IC (BRUM et al., 2011), sugere-se que estes receptores estejam associados às alterações morfofuncionais da musculatura esquelética nesta síndrome.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia e fisiopatologia da insuficiência cardíaca

As doenças do aparelho circulatório são um grande problema de saúde pública e são responsáveis por grande parte das causas de mortes no Brasil. Segundo os dados do Sistema Único de Saúde (SUS)¹, em 2007 ocorreram 308.466 óbitos no Brasil devido a doenças do aparelho circulatório, o que representou aproximadamente 30% dos óbitos ocorridos naquele ano. Dentre as diversas doenças do aparelho circulatório está a insuficiência cardíaca, a qual é via final de outras cardiomiopatias e doenças relacionadas ao sistema cardiovascular.

Conforme relatado na III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica, a IC representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e a morbimortalidade associada (BOCCHI, MARCONDES-BRAGA, AYUB-FERREIRA, ROHDE, OLIVEIRA, ALMEIDA, et al., 2009). Em 2000, o SUS realizou 398 mil internações por IC, com ocorrência de 26 mil óbitos. Além disso, a IC tem sido a principal causa de internação de pacientes com mais de 65 anos de idade, de acordo com o DATASUS (BARRETTO et al., 2002; ARAUJO et al., 2005), e este problema tende a se agravar com o envelhecimento populacional.

Dentre as principais etiologias da IC destaca-se a etiologia isquêmica caracterizada pelo suprimento insuficiente de sangue ao músculo cardíaco, causando elevação da pressão de enchimento ventricular, morte do tecido e severa disfunção cardíaca (HEART FAILURE SOCIETY OF, 2006; ZANNAD et al., 2008). Devido a importante prevalência da etiologia isquêmica na IC, o infarto do miocárdio (IM) em animais é o modelo experimental mais utilizado para se estudar alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana (ZORNOFF et al., 2009).

Independentemente da etiologia, a fisiopatologia da IC é caracterizada inicialmente por uma lesão do miocárdio que provoca prejuízo da função ventricular e diminuição do DC. Na tentativa de compensar a disfunção ventricular e manter a

¹ Fonte: MS/SVS/DASIS – Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def>, consulta realizada em junho de 2010.

perfusão tecidual necessária para suprir a demanda energética do organismo, observa-se uma hiperativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona, assim como aumento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias. Agudamente, a hiperativação destes sistemas é benéfica e desencadeia respostas compensatórias como taquicardia basal, aumento da contratilidade miocárdica e remodelamento cardíaco a fim de manter a perfusão tecidual adequada. No entanto, cronicamente essas respostas compensatórias tornam-se prejudiciais ao coração e ao organismo, agravando ainda mais o quadro de remodelamento cardíaco patológico e a disfunção ventricular (CHATTERJEE, 2005; MEDEIROS et al., 2010)

Dentre as alterações observadas na IC destacam-se anormalidades no processo de acoplamento excitação-contração, deficiência no fornecimento e utilização de energia (Clausell, 2003), alterações hemodinâmicas centrais, como diminuição do débito cardíaco durante a realização de exercício ou em repouso (em casos mais graves), elevação da pressão de enchimento ventricular esquerdo e aumento dos volumes sistólico e diastólico finais, que resultam em aumento da massa ventricular e da pressão pulmonar (Myers, 1997; Keteyian, 2009). Associadas às anormalidades centrais, ocorrem alterações periféricas secundárias, como mudança no metabolismo energético e desarranjo estrutural do músculo esquelético, diminuição da vasodilatação arterial e retenção de fluidos no estágio congestivo da IC.

Todas essas alterações fundamentam os sintomas clássicos da IC, como fadiga, dispneia e intolerância aos esforços físicos, que cronicamente contribuem ainda mais para o agravamento do quadro e piora no prognóstico do paciente (MEDEIROS, BACURAU, FERREIRA, BECHARA & BRUM, 2010).

2.2. Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca

Como descrito acima, os pacientes com IC apresentam intolerância à realização de esforços físicos, e este sintoma pode estar associado aos comprometimentos centrais presentes na síndrome (ex. diminuição do débito

cardíaco e fração de ejeção). Entretanto, muitos estudos tem demonstrado que alterações morfofuncionais da musculatura esquelética estão mais correlacionadas ao desenvolvimento da intolerância ao esforço na IC do que às alterações cardíacas (HARRINGTON et al., 1997; VENTURA-CLAPIER, GARNIER e VEKSLER, 2004). Além disso, estudos também demonstraram haver baixa correlação entre as variáveis hemodinâmicas e a capacidade de realização de exercícios físicos (MARANTZ et al., 1988; JONDEAU et al., 1992). Dessa forma, vem sendo ampliado o número de trabalhos sobre as alterações musculoesqueléticas observadas na IC.

De fato, várias alterações morfofuncionais intrínsecas da musculatura esquelética foram observadas e já são bem conhecidas em pacientes com IC. Sabe-se que a perfusão sanguínea dos músculos esqueléticos está diminuída na IC, em decorrência, não só do menor débito cardíaco, mas também da rarefação capilar e de prejuízos na vasodilatação periférica, causados pela hiperatividade simpática e por possível disfunção endotelial.

Alterações no metabolismo energético muscular também são relatadas em pacientes com IC e podem ser fatores causais da menor capacidade funcional dos mesmos. Em um teste de esforço progressivo até a exaustão, por exemplo, espera-se um padrão de sobreposição do metabolismo anaeróbio sobre o aeróbio à medida que a intensidade de exercício aumenta (JANSSEN, 2001). Em portadores de IC, a predominância do metabolismo anaeróbio ocorre precocemente, uma vez que estes apresentam maior acúmulo de lactato para uma determinada intensidade de esforço (VESCOVO, 2002).

A predominância do metabolismo anaeróbio na IC está associada à redução da atividade de enzimas oxidativas e da densidade mitocondrial na musculatura esquelética, e também está relacionada com alterações na distribuição dos tipos de fibras musculares. O músculo esquelético é composto principalmente pelas seguintes fibras musculares: as fibras do tipo I, de contração lenta, metabolismo aeróbio e resistentes à fadiga, as do tipo IIA, de contração rápida, metabolismo oxidativo/glicolítico e menos resistentes à fadiga e as fibras do tipo IIB, de contração rápida, metabolismo glicolítico e altamente fatigáveis. Na IC ocorre uma transição entre estes tipos de fibras em direção às fibras musculares com características mais glicolíticas, aumentando o percentual das fibras do tipo IIA e IIB e diminuindo o

percentual das fibras do tipo I (DREXLER et al., 1992; HAMBRECHT et al., 1997; LUNDE et al., 2001; VESCOVO, 2002).

Além das alterações na perfusão sanguínea e no metabolismo energético, existem alguns estudos que demonstram aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) (GIELEN et al., 2003; SCHULZE et al., 2003; LINKE et al., 2005) e presença de estresse oxidativo (LINKE et al., 2005; COIRAULT et al., 2007; BACURAU et al., 2009; OHTA et al., 2011) na musculatura esquelética de modelos experimentais e de pacientes com IC. Associados ou não, o processo inflamatório e o estresse oxidativo podem promover alterações na musculatura esquelética, colaborando para a piora do quadro de miopatia. Tem sido considerada a participação destes fatores na indução da atrofia muscular esquelética, que também é observada na IC (discutida do próximo tópico). No entanto, embora haja relação entre estes marcadores e a atrofia muscular na IC, a literatura ainda é pobre em estudos que confirmem a relação causa-efeito entre eles.

2.3. Atrofia muscular esquelética na insuficiência cardíaca

Dentre as alterações musculoesqueléticas observadas na IC está a atrofia muscular. É conhecido que mais de 68% dos pacientes com IC apresentam atrofia muscular (STRASSBURG, SPRINGER e ANKER, 2005), que é caracterizada pela diminuição da massa muscular esquelética, causada pela perda de organelas celulares, citoplasma e proteínas estruturais e contráteis que resultam na diminuição da área de secção transversa de uma fibra muscular ou de um conjunto delas (TISDALE, 2005; SANDRI, 2008; SUKHANOV et al., 2011). Esta atrofia pode gerar fraqueza muscular e colaborar para o quadro de intolerância aos esforços físicos, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes com IC. De fato, a literatura demonstra uma correlação positiva e significativa entre a capacidade máxima de consumo de oxigênio (VO₂ pico) e a massa muscular esquelética, ou seja, quanto menor a massa muscular, menor é a capacidade aeróbia do paciente.

Além dos comprometimentos funcionais, a atrofia muscular na IC pode, em estágios mais graves da doença, evoluir para um quadro conhecido como caquexia

(do grego *kakos*, má; *hexis*, condição). Atualmente, a caquexia é definida como uma síndrome metabólica complexa associada a doenças e caracterizada por acentuada perda de peso e massa muscular, com ou sem perda de massa adiposa (LENK, SCHULER e ADAMS, 2010). Na literatura existem diferentes índices de classificação da caquexia, que incluem perda de peso corporal maior que 7,5% em 6 meses (VON HAEHLING e ANKER, 2010), perda de peso corporal livre de edema maior que 5% em 12 meses ou menos (LENK, SCHULER e ADAMS, 2010), 10% de perda de peso corporal (LEES, 1999; BACHMANN et al., 2008) ou índice de massa corporal (IMC) abaixo de 21 kg/m² (VERMEEREN et al., 2006). A prevalência de caquexia na IC, também chamada de caquexia cardíaca, ocorre em até 53% dos pacientes com IC congestiva em classes funcionais III ou IV determinadas pela *New York Heart Association Functional Class* (NYHA) (ANDRADE e LAMEU, 2005; VON HAEHLING e ANKER, 2010). Mediante esta condição, os pacientes com caquexia cardíaca apresentam piora do quadro clínico com consequente redução na taxa de sobrevivência (MORLEY, THOMAS e WILSON, 2006). ANKER et al. (1997) observaram que pacientes com insuficiência cardíaca caquéticos apresentam maior taxa de mortalidade quando comparados a pacientes não-caquéticos da mesma classe funcional, sugerindo que a caquexia é um marcador independente de mortalidade em portadores de IC.

De uma maneira geral, a atrofia muscular é resultante de um desequilíbrio entre os sistemas de síntese e degradação proteica que culminam no catabolismo proteico (VENTADOUR e ATTAIX, 2006). Os principais processos responsáveis pela proteólise muscular esquelética são a via autofágica/lisossomal, as proteases ativadas por cálcio (calpaínas), e a via proteolítica dependente de ATP (sistema ubiquitina-proteassoma). Esses sistemas trabalham mais em harmonia do que individualmente no processo de degradação proteica (POWERS, KAVAZIS e MCCLUNG, 2007). Enquanto as proteases lisossomais são as principais responsáveis pela degradação de proteínas de membrana e organelas, como receptores, canais iônicos e mitocôndria, as calpaínas são responsáveis pelo desarranjo das miofibrilas, liberando estas proteínas para serem ubiquitinadas (HASSELGREN, WRAY e MAMMEN, 2002). Já o sistema ubiquitina-proteassoma

(SUP) assume papel fundamental na degradação de proteínas citosólicas, já que este recebe os substratos dos outros sistemas.

O SUP consiste de uma cascata de reações enzimáticas altamente organizadas que seleciona, marca e degrada proteínas alvo. Inicialmente, uma proteína ativadora (E1) utiliza ATP para ativar a ubiquitina. A ubiquitina ativada é transferida para E2 (proteína carreadora) que conjuga as ubiquitinas em um processo de poliubiquitinas. Em seguida, E3 (proteína ligase) liga as ubiquitinas conjugadas à proteína alvo. As E3 ligases são componentes chave do SUP, onde as mais expressas na musculatura esquelética são atrogin-1, MuRF-1 e E3 α (LECKER et al., 1999). Quando a proteína alvo é ligada às ubiquitinas conjugadas pelas E3 ligases, esta é reconhecida pelo 26S-proteassoma e degradada em pequenos peptídeos (8-12 aminoácidos) (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002).

Esse sistema é indicado como o principal envolvido na atrofia muscular em diversas doenças crônico-degenerativas (SUKHANOV et al., 2011), onde se observa aumento da expressão de RNA mensageiro e proteínas de algumas E3 ligases (atrogin-1 e MuRF-1) (BODINE et al., 2001; GOMES et al., 2001; STEVENSON et al., 2003), bem como das subunidades 20S α e β do proteassoma e de sua subunidade 19S reguladora (LECKER et al., 1999; PRICE, 2003; TISDALE, 2005), sendo que uma maior ativação do SUP associada à atrofia e disfunção muscular esquelética também foi observada em modelos experimentais de IC (LI et al., 2007; VAN HEES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

Já a síntese proteica ocorre sob estímulo de diferentes fatores de crescimento, como IGF-1, insulina e alguns ligantes de receptores tirosina quinase. Estes fatores resultam na ativação da proteína quinase B (Akt), a qual ativa a mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ambas serina/treonina quinases que regulam a síntese e o crescimento muscular por meio do controle da transcrição, da eficiência da tradução, da organização do citoesqueleto e da degradação proteica no músculo esquelético (BODINE et al., 2001).

Em relação à via de síntese proteica e a IC, já foi demonstrada uma redução tanto nas concentrações de IGF-1 circulante quanto muscular esquelética em situações em que a atrofia muscular estava estabelecida, sugerindo que esta via

pode contribuir para o agravamento da perda de massa muscular observada nesta síndrome (HAMBRECHT et al., 2002; SCHULZE et al., 2002).

Desta forma, considerando que a atrofia muscular e a progressão para a caquexia contribuem para o mau prognóstico da IC, torna-se fundamental o melhor entendimento dos fatores que promovem o desequilíbrio entre a participação das vias de síntese e degradação proteica nesse processo na IC.

Nesse sentido, dados da literatura mostram que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos é importante para a regulação da massa muscular, ativando vias de síntese e inibindo vias de degradação proteica (NAVEGANTES, MIGLIORINI e DO CARMO KETTELHUT, 2002; LYNCH e RYALL, 2008). Além disso, sabe-se que estes receptores são os responsáveis por mediar a ação do sistema simpático na musculatura esquelética. Portanto, considerando que a hiperatividade simpática é característica na IC, sugere-se que esses receptores poderiam estar relacionados às alterações musculoesqueléticas observadas na síndrome.

2.4. Sistema nervoso simpático e receptores β -adrenérgicos

O sistema cardiovascular é finamente regulado pelo sistema nervoso simpático (BRUM et al., 2006). As catecolaminas adrenalina e noradrenalina (neurotransmissor) são as principais moléculas químicas sinalizadoras do sistema nervoso simpático, e a resposta desencadeada após a ligação de uma dessas moléculas a um receptor adrenérgico é dependente do subtipo deste receptor (LYNCH e RYALL, 2008). Existem diversos subtipos de receptores adrenérgicos conhecidos, incluindo seis do subtipo α e três do subtipo β , que estão localizados em diferentes proporções em inúmeros tecidos do corpo. Os subtipos de receptores β -adrenérgicos são β_1 , β_2 e β_3 e estão localizados no coração, nos vasos, no pulmão, nos rins, no tecido adiposo e, predominantemente, na musculatura esquelética (AHLQUIST, 1948; JOHNSON, 1998; LYNCH e RYALL, 2008).

Os receptores β -adrenérgicos, assim como os outros receptores adrenérgicos, pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR – “*Guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*”), o maior grupo de

receptores de membrana em mamíferos, e que corresponde a mais de 1% do genoma humano (FREDRIKSSON et al., 2003). Todos os GPCRs, incluindo os receptores adrenérgicos, possuem uma estrutura similar, composta de sete α -hélices (MORRIS e MALBON, 1999). Já as proteínas G estão localizadas no citoplasma da célula e agem no espaço intracelular, interagindo com as alças intracelulares do GPCR. Elas são formadas por três subunidades conhecidas como $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. As subunidades $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) formam um dímero de forte ligação com a membrana intracelular, enquanto a subunidade α ($G\alpha$) é acoplada ao dímero $G\beta\gamma$ somente em seu estado inativo (BOCKAERT e PIN, 1999).

Considerando a existência de diversos subtipos de $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$, pode-se imaginar que há um grande número de combinações $G\alpha\beta\gamma$ que controlam a sinalização dos receptores acoplados à proteína G. Além disso, tanto a subunidade $G\alpha$, como o dímero $G\beta\gamma$ são capazes de ativar cascatas de sinalização (LOHSE, 1999; WENZEL-SEIFERT e SEIFERT, 2000; DASCAL, 2001; KUHN et al., 2002).

Os receptores β -adrenérgicos são conhecidos por acoplarem, predominantemente, às isoformas $G\alpha_s$ e $G\alpha_i$ (FIGURA 1). A via de sinalização clássica envolve a ativação da adenilil ciclase (AC) via proteína G estimulatória ($G\alpha_s$), resultando em aumento das concentrações intracelulares de AMPc. O aumento da concentração de AMPc que ativa a proteína quinase A (PKA) que é responsável pela fosforilação de inúmeras proteínas intracelulares. Além desta via clássica de sinalização onde o receptor acopla-se à proteína $G\alpha_s$, tem sido demonstrado que o subtipo β_2 -adrenérgico pode agir por uma via alternativa, denominada não-clássica, pelo seu acoplamento com a proteína G inibitória ($G\alpha_i$). Com a ativação desta via, ocorre diminuição dos níveis de AMPc, com efeito antagônico à ativação da via $G\alpha_s$ (BRUM et al., 2006).

FIGURA 1: A via de sinalização β -adrenérgica envolve o receptor, a proteína G e a adenilil ciclase ligada à membrana celular. Adaptado de LYNCH e RYALL (2008).

2.5. Receptores β -adrenérgicos e músculo esquelético

Como citado anteriormente, na musculatura esquelética a atividade nervosa simpática é mediada por receptores β -adrenérgicos que estão presentes na membrana das células musculares (WILLIAMS e BARNES, 1989; PETERS et al., 1998). Cerca de ~90% dos receptores β -adrenérgicos presentes no músculo esquelético são do subtipo β_2 (ELFELLAH et al., 1989). Além do subtipo β_2 , é encontrado na musculatura esquelética um percentual aproximado de 7-10% de receptores adrenérgicos do subtipo β_1 (WILLIAMS, CARON e DANIEL, 1984; KIM et al., 1991).

Existem diferenças quanto à densidade de receptores β -adrenérgicos nos diferentes tipos de fibras musculares, onde, as fibras do tipo I apresentam densidade duas a três vezes maior de receptores β -adrenérgicos do que as fibras do tipo II (MARTIN, MURPHREE e SAFFITZ, 1989; KIM et al., 1991; JENSEN, BRORS e DAHL, 1995) o que corrobora a maior densidade de receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos em músculos oxidativos em comparação a músculos glicolíticos (ELFELLAH et al.,

1989; MARTIN, MURPHREE e SAFFITZ, 1989; RYALL et al., 2002; RYALL et al., 2004). De fato, JENSEN et al. (2002) observaram que o músculo sóleo de ratos (músculo postural, predominantemente aeróbio e composto principalmente por fibras do tipo I) 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. Além disso, no músculo sóleo observa-se um maior percentual de receptores do subtipo β_1 -adrenérgicos do que no músculo plantar (músculo de contração rápida, predominantemente anaeróbio e com alta porcentagem de fibras do tipo II) (KIM et al., 1992).

Essas diferenças se mostram importantes quando se relaciona a 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. Além disso, a ação anti-proteolítica e anabólica da atividade simpática (discutida no item seguinte) é essencial para a manutenção da função e estrutura de músculos oxidativos posturais, compostos principalmente por fibras do tipo I. Isso pode explicar, em parte, a alta densidade de receptores presentes neste tipo de fibra (NAVEGANTES et al., 2004). No entanto, o significado funcional desta diferença de densidade ainda não é completamente conhecido, uma vez que a resposta a agonistas β -adrenérgicos parece ser maior em músculos glicolíticos (RYALL et al., 2002; RYALL, SILENCE e LYNCH, 2006).

A estimulação desses receptores β -adrenérgicos na musculatura esquelética ocorre por meio da ação das catecolaminas plasmáticas adrenalina e noradrenalina (NAVEGANTES, MIGLIORINI e DO CARMO KETTELHUT, 2002). Alguns estudos também sugerem que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos acontece por meio da inervação simpática em fibras musculares estriadas de mamíferos (NAVEGANTES et al., 1999; NAVEGANTES, BAVIERA e KETTELHUT, 2009). No entanto, o papel fisiológico dessa ativação simpática na musculatura esquelética ainda não está bem esclarecido). Dentre os efeitos dessa estimulação são observados hipertrofia muscular e mudança no tipo de fibra (I $\rightarrow$ II) (YANG e

MCELLIGOTT, 1989). Ou seja, o estímulo simpático parece levar o tecido muscular esquelético a ter características mais anaeróbicas. Além disso, a literatura traz diversos estudos que evidenciam a participação da atividade simpática por meio dos receptores β_2 -adrenérgicos em efeitos anabólicos e anti-atróficos no músculo esquelético.

Um estudo realizado por JONES, BAKER e GREENHAFF (2003) mostrou que oito semanas de administração do agonista de receptor β_2 -adrenérgico, BRL-47672, via injeção subcutânea provocou um remodelamento na miosina de cabeça pesada (MHC) do tipo I (oxidativa) para IIA (oxidativa/glicolítica) no músculo sóleo e de IIA (oxidativa/glicolítica) para o tipo IIB (glicolítica) no músculo gastrocnêmio. Da mesma forma, tem sido demonstrado em diversos modelos animais e em humanos que agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos atuam na regeneração da musculatura esquelética em modelos de atrofia muscular. Em um modelo de denervação cirúrgica na musculatura esquelética de ratos, foi demonstrado que a utilização de clenbuterol (agonista β -adrenérgico de terceira geração, seletivo para receptores β_2 -adrenérgicos) e isoproterenol (agonista β -adrenérgico de primeira geração, não seletivo) durante 30 dias não só preveniu como reverteu a perda de massa magra dos animais desnervados, além de ter aumentado a massa muscular do grupo controle (AGRAWAL, THAKUR e KATOCH, 2003).

Outro trabalho, realizado por HARCOURT et al. (2007) mostrou uma melhora na função muscular esquelética e aumento na área de secção transversa das fibras musculares com a administração de formoterol (agonista β_2 -adrenérgico) por quatro semanas em modelo de distrofia muscular (distrofia mdx) em camundongos. Além disso, o uso por sete dias dessa mesma droga, o formoterol, demonstrou queda na taxa de apoptose de células musculares de camundongos e ratos com câncer (BUSQUETS et al., 2004).

NAVEGANTES et al. (2000) demonstraram, em músculos isolados (*in vitro*), que a presença, tanto de clenbuterol, como de isoproterenol e epinefrina foi capaz de reduzir a proteólise muscular em 15-20% nos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL). Por outro lado, nenhuma alteração na proteólise foi observada a partir da estimulação com fenilefrina, um agonista não seletivo de receptor α -adrenérgico.

A maioria dos trabalhos realizados até então envolvendo os receptores β_2 -adrenérgicos na musculatura esquelética estabeleceram a relação causa-efeito desses receptores e a morfologia e função muscular, utilizando manobras de inibição (antagonistas) ou estimulação (agonistas) dos mesmos. No entanto, a sinalização intracelular responsável por estas respostas ainda não é totalmente conhecida, uma vez que somente estudos mais recentes tem buscado esclarecer essas questões.

2.6. Sinalização β -adrenérgica no músculo esquelético

Muito do nosso conhecimento sobre a sinalização β -adrenérgica na musculatura esquelética é baseado em trabalhos desenvolvidos em músculo cardíaco (SHAM, JONES e MORAD, 1991; XIAO et al., 1994; XIAO et al., 1999; ROCKMAN, KOCH e LEFKOWITZ, 2002; LYNCH e RYALL, 2008). Somente há pouco tempo começou-se a apreciar a importância de se conhecer mais profundamente este sistema necessário ao crescimento, desenvolvimento e reparo do músculo esquelético (HINKLE et al., 2002; BEITZEL et al., 2004; LYNCH, SCHERTZER e RYALL, 2007).

Como visto no item 2.4, sabe-se que os receptores β_2 -adrenérgicos se acoplam aos subtipos $G\alpha_s$ e $G\alpha_i$ da proteína G, sendo o acoplamento à proteína $G\alpha_s$ o responsável pela ativação da via clássica da sinalização β -adrenérgica (FIGURA 2). Assim como no coração, acredita-se que, na musculatura esquelética, esta via aumente a atividade da PKA por meio de AC e AMPc (CHOO et al., 1992; NAVEGANTES et al., 2001; NAVEGANTES, MIGLIORINI e DO CARMO KETTELHUT, 2002), e a PKA, por sua vez, fosforila diversas proteínas importantes para a manutenção da função e estrutura musculares. Em relação à função muscular, a PKA fosforila, sob estímulo adrenérgico, proteínas responsáveis pela homeostase do Ca^{2+} , como a RyR e a fosfolambam/SERCA. Isto faz com que o influxo de Ca^{2+} aumente no citoplasma da célula muscular esquelética, promovendo aumento na força de contração.

Além de regular o processo de contração muscular, a sinalização β_2 -adrenérgica, por meio da via AC/AMPC/PKA, pode interferir no controle da massa muscular (FIGURA 2). As subunidades catalíticas da PKA parecem fosforilar a proteína calpastatina ativando-a. Isso leva a uma redução na ação proteolítica das calpaínas uma vez que a calpastatina é o principal inibidor endógeno das calpaínas (HAWKINS, XU e NARAYANAN, 1995; NAVEGANTES et al., 2001; REIKEN et al., 2003). Existem dois tipos de calpaínas expressas no músculo esquelético, μ -calpaína e m-calpaína e a inibição de uma dessas enzimas, pela fosforilação da calpastatina, pode reduzir o nível da proteólise dependente de Ca^{2+} (TIDBALL e SPENCER, 2000; NAVEGANTES et al., 2001; TIDBALL e SPENCER, 2002). Sob este ângulo, a estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos parece atuar positivamente, colaborando para a inibição do catabolismo proteico.

Em paralelo à via de sinalização $\text{G}\alpha_s$ -AMPC, estudos têm demonstrado a participação da subunidade $\text{G}\beta\gamma$ em vários processos celulares, o que pode ser de grande relevância para o entendimento da sinalização β -adrenérgica na musculatura esquelética (CRESPO et al., 1994; FORD et al., 1998; DIVERSE-PIERLUISSI et al., 2000; DASCAL, 2001; MIRSHAHI et al., 2002). Mais especificamente, experimentos em cultura de célula revelaram que a subunidade $\text{G}\alpha_i$ ligada à subunidade $\text{G}\beta\gamma$ é capaz de ativar a via de sinalização da PI3K-Akt (LOPEZ-ILASACA et al., 1997; MURGA et al., 1998; MURGA, FUKUHARA e GUTKIND, 2000). No músculo esquelético, vias de sinalização dependentes de Akt são ativadas com a estimulação β -adrenérgica, e isso quase sempre resulta em hipertrofia muscular (SNEDDON et al., 2001; KLINE et al., 2007). KLINE et al. (2007) descobriram que a estimulação β -adrenérgica promovia a fosforilação da Akt com subsequente ativação da via da mTOR.

Além de estimular a via da mTOR, a Akt inativa a via GSK3 β (glicogênio sintase quinase) que, quando ativada, desencadeia a inibição da síntese proteica (BODINE et al., 2001). Da mesma forma, a Akt minimiza a ação do sistema proteolítico dependente de ATP (sistema ubiquitina-proteassoma) por meio da fosforilação de FoxO, um fator de transcrição presente no núcleo da célula que, quando não fosforilado, promove a transcrição de atrogenes, mais especificamente MuRF-1 e atrogin-1/MAFbx (FURUYAMA et al., 2002; TRAN et al., 2003; SANDRI et

al., 2004; STITT et al., 2004). Tem sido demonstrado que a ativação β -adrenérgica reduz a expressão de MuRF-1 e atrogin-1 em músculos esqueléticos de animais desnervados e com suspensão de pata, um efeito possivelmente mediado pela inibição de FoxO por Akt (KLINE et al., 2007).

FIGURA 2: Principais vias de sinalização celular desencadeadas pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos, relacionadas com a estrutura e função musculares.

Os estudos evidenciam, portanto, que o efeito anabólico e anti-atrófico dos receptores β_2 -adrenérgicos parecem ser consequência da ativação de vias que sinalizam a síntese proteica e da inibição de vias de proteólise. No entanto, trabalhos ainda precisam ser desenvolvidos a fim de melhor elucidar as vias de sinalização β -adrenérgica e de definir os percentuais de participação de cada via no controle de massa muscular, tanto em situações basais, de homeostase, como em situações patológicas, como a insuficiência cardíaca, por exemplo.

Dessa forma, considerando que os receptores β_2 -adrenérgicos medeiam a atividade do sistema nervoso simpático na musculatura esquelética, e que a

hiperatividade simpática é um dos principais componentes envolvidos no desenvolvimento da miopatia esquelética observada na IC (BRUM et al., 2011), foi objetivo do presente estudo investigar a associação entre os receptores β_2 -adrenérgicos e as alterações morfofuncionais da musculatura esquelética desencadeadas pela IC.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliar a participação da via de sinalização β_2 -adrenérgica para o fenótipo muscular esquelético de animais controle (CO) e com inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 KO) após a indução de infarto pela ligadura da artéria coronária esquerda (INF) ou submetidos ao procedimento cirúrgico sem indução de infarto (SHAM).

3.2. Específicos

Para os grupos CO e KO, SHAM e INF realizar 90 dias após a cirurgia de infarto do miocárdio ou sham:

- o acompanhamento da massa corporal;
- o registro indireto da FC e PA caudal em repouso, 90 dias pós cirurgias;
- a avaliação da tolerância à realização de esforço físico em esteira rolante, 90 dias pós cirurgias;
- a avaliação funcional da musculatura esquelética *in vivo*,
- a avaliação da função ventricular;
- a avaliação da área de infarto do coração;
- a razão peso úmido/seco do músculo tibial anterior e do pulmão;
- a tipagem de fibras nos músculos sóleo e plantar;
- a análise da razão capilar/fibra muscular nos músculos sóleo e plantar;
- a área da secção transversa dos diferentes tipos de fibras nos músculos sóleo e plantar;

- a quantificação do conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio;
- a quantificação de glicose circulante;
- a concentração plasmática de noradrenalina e adrenalina;
- a expressão das proteínas Akt1, p-Akt (ser 473), p70S6K, 4E-BP1, p-4E-BP1 (thr70 e thr37/46), FoxO3a, p-FoxO3a (ser 253), atrogin-1, MuRF-1 e proteínas poliubiquitinadas no músculo plantar;
- a atividade do proteassoma no sítio catalítico da quimiotripsina no músculo plantar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostra

Para a realização do presente projeto de pesquisa foram utilizados camundongos machos CO e β_2 KO da linhagem FVB com 4 meses de vida no início do protocolo experimental. Os camundongos utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da USP (EEFEUSP), onde também foram mantidos durante todo o período experimental 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*.

O presente projeto de pesquisa está de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CEP nº26708/EEFE/19122008).

4.2. Desenho experimental

Os animais CO e β_2 KO foram submetidos às cirurgias de infarto do miocárdio ou sham aos 4 meses de idade. Após 90 dias foram realizadas análises *in vivo* (na seguinte sequência: função cardíaca, de pressão arterial e frequência cardíaca de repouso, de função muscular e tolerância ao esforço físico). Quarenta e oito horas após o teste de tolerância ao esforço físico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tecidos foram dissecados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para a realização das análises propostas no presente projeto, como ilustrado no QUADRO 1.

QUADRO 1: Desenho experimental do estudo.

As análises foram realizadas 90 dias após os procedimentos cirúrgicos, uma vez que os animais CO e β_2 KO infartados apresentam queda estatisticamente significativa do desempenho físico neste tempo, como observado anteriormente em estudo piloto (FIGURA 3). Uma padronização em curso temporal foi feita a partir da realização de testes de tolerância ao esforço físico aos 30, 45, 75 e 90 dias após os procedimentos cirúrgicos, a fim de detectar o momento pós-cirurgias de maior prejuízo do desempenho físico para os animais. Os dados sugeriram, em conjunto, que aos 75 dias após a cirurgia de infarto, o prejuízo no desempenho físico começa a ser significativo, principalmente para o grupo KO INF e esse prejuízo é estabelecido aos 90 dias pós-infarto para os dois genótipos. A partir destes resultados, o período de 90 dias após as cirurgias foi considerado ideal para a realização de testes *in vivo*, para o sacrifício, coleta de tecidos e análises da musculatura esquelética, já que a intolerância aos esforços físicos está diretamente relacionada às alterações musculoesqueléticas, conforme descrito anteriormente.

FIGURA 3: Distância percorrida em metros pelos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF nos testes de tolerância ao esforço físico realizados aos 30, 45, 75 e 90 dias após as cirurgias de infarto e sham. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média. Para a análise dos dados foi utilizada ANOVA de dois caminhos para medidas repetidas com *post-hoc* de Duncan, assumindo nível de significância de $p \leq 0,05$, sendo @ vs. 30 dias do mesmo grupo, \$ vs. 75 dias do mesmo grupo, † vs. SHAM do mesmo genótipo aos 90 dias e & igual a KO SHAM vs. CO SHAM em todos os tempos.

4.3. Controle ponderal da massa corporal

O controle da massa corporal foi realizado por balança *GEHAKA*[®] durante o início do protocolo experimental e antes do sacrifício.

4.4. Registro indireto da pressão arterial caudal e frequência cardíaca em repouso

A medida indireta da pressão arterial caudal foi realizada por método de pletismografia de cauda utilizando um sistema específico para camundongos (*IITC Life Science Model 31*, EUA), composto por três cilindros restritores (ajustáveis ao tamanho do animal) montadas dentro de uma caixa acrílica aquecida o suficiente para vasodilatar a arterial caudal. Em seguida, um esfigmomanômetro (adaptado para camundongos) foi colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução

total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal e após isso, a pressão do aparelho foi diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial. Foram feitas nove aferições por animal, com um intervalo de quatro segundos entre elas.

O sinal de pressão arterial foi captado por um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal, que por sua vez é conectado ao sistema, onde este sinal é então repassado, em tempo real, para um programa de microcomputador (*software BpMonWin*). Ao final das aferições, os valores médios de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso foram gerados automaticamente pelo programa. Foram descartados o maior e o menor valor de pressão arterial e frequência cardíaca de cada animal e a média final foi calculada com os valores restantes.

Durante a semana que antecedeu o início dos registros foi realizada uma adaptação dos animais ao aparelho, que consistiu de um registro completo por animal por dia.

4.5. Avaliação funcional da musculatura esquelética

Rota Rod. Para avaliar a função muscular dos grupos estudados, foi utilizado o teste Rota Rod, considerado padrão ouro para a avaliação da função muscular relacionada à coordenação motora. O aparelho utilizado para este teste foi o modelo 755 da IITC Life Science (Califórnia, EUA) programado para apresentar velocidade inicial de 1rpm e velocidade final de 40rpm, que é alcançada 300 segundos após o início do movimento - a aceleração foi constante durante todo o experimento. Foram realizadas 3 tentativas por animal, com intervalo de 10 segundos entre elas. As seguintes variáveis são informadas pelo aparelho após a queda dos animais: velocidade final, tempo até a queda e distância percorrida (SERRADJ e JAMON, 2007).

Deambulação. A avaliação da deambulação possui uma grande correlação com a força muscular, sendo um ótimo indicativo da funcionalidade da muscular

esquelética. Neste teste, as patas traseiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles foram posicionados em uma caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para caminharem por 3 tentativas. Antes de terem as patas pintadas, os animais caminharam pela caixa 3 vezes, para fins de familiarização. Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido e a média dos comprimentos das passadas foi corrigida pelo comprimento naso-anal de cada animal (KENNEL et al., 1996; VIEIRA et al., 2008).

4.6. Quantificação da área de infarto

Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual e coloração por hematoxilina-eosina e picrossírius red. A determinação do percentual da área infartada foi realizada calculando-se a razão do perímetro da circunferência cardíaca total pelo perímetro da área infartada (PFEFFER et al., 1979).

4.7. Teste de tolerância ao esforço

A capacidade máxima de realização do exercício físico foi estimada pelo teste progressivo até a exaustão em esteira rolante (FERREIRA et al., 2007). Para isso, os animais realizaram um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, que iniciou com velocidade de 6 m/min, sem inclinação. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de 3 m/min até a exaustão do animal, ou seja, o teste terminou quando o animal não conseguia manter o padrão da corrida. As variáveis avaliadas foram a velocidade final (m/min) e a distância total percorrida (metros) por cada animal durante o teste máximo.

Durante a semana que antecedeu o teste máximo, foi realizada uma adaptação dos animais à esteira. Os animais caminharam na esteira em baixa velocidade (6 m/min a 9 m/min) por 10 minutos todos os dias, durante 5 dias.

4.8. Modelo experimental de Insuficiência cardíaca por infarto do miocárdio em camundongos

O infarto do miocárdio foi baseado na técnica descrita por JOHNS e OLSON (1954) em que a artéria coronária esquerda era ligada provocando importante isquemia miocárdica no ventrículo esquerdo. Os animais foram pesados e anestesiados com o anestésico pentobarbital (30mg/Kg) por via intraperitoneal e, em seguida, fixados em decúbito dorsal, com as quatro patas e cabeça mantidas em extensão. Nesse momento, foi introduzida uma cânula traqueal (Gelco-22G), conectada a um respirador para pequenos animais (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, EUA), que manteve o animal com a respiração artificial de 100 incursões por minuto e um volume de ar de 1,0 ml por incursão durante todo o procedimento cirúrgico com adição de gás oxigênio.

Foi realizada uma toracotomia no terceiro espaço intercostal esquerdo, o corte foi feito no sentido transversal, acompanhando o sentido das costelas, iniciando-se na altura do esterno e seguindo no sentido distal por aproximadamente 0,5 centímetro, sendo colocado um afastador entre as costelas para permitir melhor visualização do coração. Em seguida, o pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado com um chumaço de algodão, para visualização da artéria coronária esquerda. Esta foi ligada (fio agulhado mononylon 7.0) provocando a isquemia miocárdica.

Após a ligadura da artéria coronária, a incisão torácica foi fechada (fio agulhado de mononylon 6.0) e o pneumotórax eliminado mediante a sucção do ar com uma agulha hipodérmica descartável (0,45 x 13 mm), conectada a uma seringa de 5 ml. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele suturada (fio mononylon 5.0). Ao final da cirurgia, o animal foi retirado da ventilação artificial e colocado em uma caixa de acrílico com entrada para oxigênio e a temperatura corporal mantida constante por meio de aquecimento com lâmpada infravermelha. Após a recuperação, os animais retornaram às caixas habituais. Após 30 dias da cirurgia os primeiros sinais de disfunção cardíaca começam a aparecer (SHIOURA, GEENEN e GOLDSPINK, 2007).

4.9. Avaliação da Função Ventricular

A avaliação da função ventricular foi realizada por medida ecocardiográfica, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978). É importante salientar que a acurácia e a reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as estruturas anatômicas cardíacas e as medidas dos diâmetros das cavidades em roedores têm sido confirmadas em uma série de estudos (LITWIN et al., 1994; CHAVES, WEINSTEIN e BAUER, 2001; JANSSEN, DALLMEIJER e VAN DER WOUDE, 2001).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um único observador, cego para o genótipo, após trinta dias das cirurgias SHAM e infarto para todos os grupos estudados. Em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente as médias aritméticas dessas medidas. O animal foi posicionado lateralmente, a fim de expor o hemitórax esquerdo que foi cuidadosamente depilado. Sobre o precórdio do animal foi aplicado um gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, EUA). O exame ecocardiográfico foi realizado utilizando o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, EUA), equipado com transdutor de 15 MHz, em animal anestesiado com pentobarbital (30mg/Kg). Para a medida das estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo M posicionado ao nível da valva aórtica.

Após a realização das medidas foi calculada a fração de encurtamento (FE) do ventrículo esquerdo ($\%FE = [(DDFVE - DSFVE) / DDFVE] \times 100$), utilizado como índice de função sistólica. O exame foi realizado em colaboração com o Dr. Paulo Magno do Instituto do Coração (InCor-FMUSP), ecocardiografista experiente, cego para o genótipo dos animais.

4.10. Sacrifício e coleta de tecidos

Noventa dias após a cirurgia fictícia (sham) ou de infarto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) [♦]

O coração, os músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio, e os depósitos de gordura branca retroperitoneal e periepididimal foram cuidadosamente dissecados, pesados e congelados em nitrogênio líquido ou em freezer (-80°C), dependendo do experimento a que foram destinados. Assim, além da utilização para obtenção das massas, o coração e os músculos sóleo e plantar foram utilizados para análise morfológica, enquanto que o gastrocnêmio foi utilizado para quantificação de glicogênio. Já o plantar também foi utilizado para avaliação de expressão proteica e atividade do proteassoma.

Os pulmões e o músculo tibial anterior também foram dissecados para o cálculo da razão massa úmida/massa seca como um índice de edema pulmonar e muscular, respectivamente.

Além disso, o sangue também foi coletado em tubos com heparina, e submetido à centrifugação (15 minutos a 3000 rpm) para a separação do plasma, o qual foi utilizado para a dosagem de catecolaminas e de glicose.

4.11. Razão peso úmido/seco do músculo esquelético e do pulmão

As razões peso úmido/seco do pulmão e do músculo tibial foram usadas como um indicativo de acúmulo de água nos pulmões e no músculo esquelético, uma vez que o aparecimento de edemas é característico na presença de insuficiência cardíaca.

Após o sacrifício, o músculo tibial e o pulmão foram removidos e submetidos à secagem em estufa (37°C) e pesados a cada 24 horas até que não houvesse mais

[♦] Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

alteração de massa, permitindo o cálculo da razão massa úmida/massa seca como um índice de edema muscular e pulmonar, respectivamente.

4.12. Massa dos depósitos de gordura branca retroperitoneal e periepididimal

As massas dos depósitos de gordura branca retroperitoneal e periepididimal foram aferidas com o objetivo de obter um parâmetro direto da avaliação da composição corporal dos animais estudados.

4.13. Quantificação do conteúdo de glicogênio muscular

A quantificação do conteúdo de glicogênio muscular foi realizada a fim de avaliar se haveria depleção de glicogênio decorrente da hiperatividade simpática na IC e a para avaliar a contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos nessa resposta. A porção branca do músculo gastrocnêmio foi dissecada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°. Os músculos foram digeridos em solução KOH (30%) a 100°C, e o glicogênio foi precipitado após a adição de etanol (70%) e centrifugação a 3500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de glicogênio passou por duas lavagens com ácido tricloroacético (TCA) 5%, onde foi obtido o glicogênio pronto para ser quantificado. A concentração de glicogênio foi estimada por método colorimétrico com uma solução de antrona (0,2% de solução de antrona em ácido sulfúrico 95%). O método foi adaptado de (H BALMAIN, BIGGERS e CLARINGBOLD, 1956).

4.14. Determinação da Concentração Plasmática de Glicose

A concentração de glicose plasmática (mg/dL) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit Glicose HK Liquiform (Labtest Diagnóstica).

4.15. Concentração Plasmática das Catecolaminas

A concentração plasmática de noradrenalina tem sido utilizada na prática clínica como um indicador da atividade simpática periférica (ESLER et al., 1986; ESLER et al., 1995). Por isso, a medida da concentração plasmática de catecolaminas foi analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Dulce Casarini, da Universidade Federal de São Paulo.

4.16. 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 goma alcantra (*Sigma-Aldrich*, EUA) com *Optimal Cutting Temperature* – OCT (*Tissue-Tek*®, EUA) para manter o tecido na posição correta pré-congelamento, pela região tendinosa.

Posteriormente à fixação na goma alcantra, a loja posterior foi mergulhada em isopentano, crioprotetor que evita artefatos nas amostras, e em seguida congelada em nitrogênio líquido onde foi mantida até que os cortes fossem realizados.

Após a obtenção dos cortes foram realizadas reações adaptadas de (BROOKE e KAISER, 1970), que permitiram a avaliação da atividade da enzima miosina ATPase por soluções com diferentes pHs (4,6 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 4,6, 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 4,6) durante 10 min.

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

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 5 minutos. Em seguida, os cortes foram mantidos em solução 0.5% de sulfeto de amônio por 3 minutos, sendo finalmente enxaguados com água destilada e montados com gelatina-glicerina.

A captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x para determinar a tipagem e área de secção transversa das fibras dos músculos plantar e sóleo e 400x e objetiva de 40x para a determinação da capilarização dos músculos plantar e sóleo. 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) (FIGURA 4). Não foram atribuídos números de campos para a análise, pois a avaliação foi realizada no tecido inteiro.

As análises de tipagem, área de secção transversa e capilarização das fibras musculares foram realizadas por um único observador, por meio do programa *Image-Pro Plus*, de acordo com BACURAU et al. (2009).

FIGURA 4: Disposição dos músculos sóleo e plantar, nos diferentes pHs: 10,3 (A) e 4,6 (B) de um camundongo controle.

4.16.1. Distribuição de fibras musculares

Para a determinação da distribuição de fibras musculares foi realizada a comparação entre as colorações obtidas a partir dos ensaios descritos acima e as fibras do tipo I, IIA e IIB foram identificadas segundo HAMALAINEN e PETTE (1993). Foram classificadas como intermediárias todas as fibras que não foram identificadas como I, IIA ou IIB.

4.16.2. Determinação da área de secção transversa

A quantificação da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar foi realizada por meio do programa *Image-Pro Plus* e utilizada como indicativo de perda ou ganho de massa muscular nos animais, o que permitiu identificar possíveis alterações decorrentes da presença ou ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos. Os resultados foram expressos em μm^2 .

4.16.3. Análise da razão capilar por fibra muscular

A razão capilar por fibra muscular foi avaliada por meio do programa *Image-Pro Plus* em pH 10,3, em uma magnificação de 400x nos músculos sóleo e plantar. Foi realizada a contagem do número de capilares e o número de fibras contidas em cada campo de imagem e a soma dos valores obtidos em cada campo foi utilizada para a realização do seguinte cálculo: número total de capilares/número total de fibras em um músculo inteiro. A FIGURA 5 mostra como os capilares são identificados nas imagens.

FIGURA 5: Capilarização em diferentes músculos: sóleo (A), plantar (B) e porção branca do gastrocnêmio (C) em camundongo controle.

4.17. Western Blotting

O músculo plantar foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão de fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), sucrose 0,3M, DTT 0,5mM, EDTA 1mM (pH 8,0), PMSF 0,3mM, NaF 10mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100). O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5ml e a concentração de proteína das amostras analisada por meio do método de Bradford (Bio-Rad - EUA). Alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de serem utilizadas.

A análise dos níveis proteicos foi realizada pela técnica de *Western blotting*. Para isso, será utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA) do mesmo modo que serão separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com Ponceau S, para a verificação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

A membrana de nitrocelulose foi, então, incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de enxaguar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a horseradish peroxidase (HRP),

direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário, onde, posteriormente, as bandas foram visualizadas e quantificadas (número de pixels) pelo sistema Image J, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

Os anticorpos utilizados foram p-Akt (ser473) (Cell Signaling Technology, EUA), Akt1 (abcam[®], UK), p70S6 Kinase (Cell Signaling Technology, EUA), 4E-BP1 (Cell Signaling Technology, EUA), p-4E-BP1 (thr70) (Cell Signaling Technology, EUA), p-4E-BP1 (thr37/46) (Cell Signaling Technology, EUA), FoxO3a (Cell Signaling Technology, EUA), p-FoxO3a (ser253) (Cell Signaling Technology, EUA), Atrogin-1 (Anti-Fbx-32, abcam[®], UK), MuRF-1 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), proteínas poliubiquitinadas (Ubiquitin Antibody, Cell Signaling Technology, EUA), GAPDH (Cell Signaling Technology, EUA) e anticorpos secundários (anti-rabbit IgG e anti-mouse IgG, Cell Signaling Technology, EUA).

4.18. Atividade Proteassomal

A atividade proteassomal foi avaliada por meio do ensaio fluorimétrico no músculo plantar, utilizando o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), conforme descrito por LU et al. (2008). Esse substrato é específico para o sítio proteolítico quimiotripsina do proteassoma.

4.19. Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de dois caminhos (genótipo e cirurgia como fatores independentes). Essa análise foi realizada no programa Statistica (StatSoft, Inc., EUA) e para todas as análises foi utilizado *post-hoc* de Duncan e nível de significância $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos durante o estudo a partir de três lotes de animais. Foram utilizados 174 camundongos machos da linhagem FVB, sendo 76 controles e 98 β_2 KO. No entanto, como é possível observar na FIGURA 6, somente 66 animais sobreviveram às cirurgias de infarto/sham, sendo que, dos 108 animais que morreram antes do final do protocolo experimental, 71 morreram durante as cirurgias de infarto ou sham e 37 animais morreram após a realização das cirurgias, durante o andamento do estudo.

FIGURA 6: Número de mortes de animais CO e KO durante e após as cirurgias de infarto e sham, e número de animais sobreviventes aos 90 dias pós-cirurgias.

Dos 66 animais sobreviventes às cirurgias foram selecionados para a continuação dos experimentos somente os animais infartados com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo inferior a 35%. Portanto, outros 15 animais foram excluídos do estudo, totalizando 51 animais. A partir de então, os camundongos remanescentes constituíram os grupos CO SHAM (controle sham), CO INF (controle infartado), KO SHAM (β_2 KO sham) e KO INF (β_2 KO infartado), como mostra a TABELA 1.

TABELA 1: Organização dos grupos e número de animais estudados.

	CO		KO	
	SHAM	INF	SHAM	INF
Número de animais	14	11	14	12

5.1. Avaliação da função ventricular

A avaliação da função ventricular foi realizada a fim de verificar se a técnica de infarto do miocárdio havia sido efetiva em induzir disfunção do ventrículo esquerdo e remodelamento cardíaco e para avaliar se a inativação do receptor β_2 -adrenérgico poderia influenciar tais parâmetros cardíacos nos animais KO SHAM.

Como é possível notar na TABELA 2, não foram observadas diferenças entre os grupos KO SHAM e CO SHAM em relação a todos os parâmetros ecocardiográficos. No entanto, ambos os grupos CO INF e KO INF apresentaram disfunção contrátil e remodelamento cardíaco significantes. Houve redução significativa da fração de encurtamento (FEnc) 90 dias pós infarto, demonstrando a eficácia da técnica e o prejuízo da função cardíaca. Além disso, o infarto promoveu aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole e em diástole dos animais CO e KO infartados em relação aos seus respectivos grupos SHAM, sendo que esse aumento foi maior no grupo KO INF quando comparado ao grupo CO INF. Da mesma forma, os animais CO INF e KO INF apresentaram aumento da espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole e em diástole. Entretanto, a espessura do septo interventricular em sístole diminuiu nos animais KO INF, o que não aconteceu para o mesmo parâmetro em diástole. É interessante notar que, ao contrário do que ocorreu com o parâmetro de diâmetro ventricular esquerdo, o aumento da espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole foi menor no grupo KO INF quando comparado ao grupo CO INF.

TABELA 2: Parâmetros ecocardiográficos.

	CO		KO	
	SHAM (n=14)	INF (n=11)	SHAM (n=14)	INF (n=12)
FEnc (%)	48 ± 2	26 ± 2 *	45 ± 1 +	22 ± 1 *#
DSFVE (mm)	1,65 ± 0,08	3,09 ± 0,13 *	1,74 ± 0,06 +	3,72 ± 0,10 *#+
DDFVE (mm)	3,20 ± 0,12	4,18 ± 0,15 *	3,15 ± 0,08 +	4,78 ± 0,12 *#+
SIVS (mm)	0,74 ± 0,04	0,93 ± 0,07 *	0,85 ± 0,03	0,70 ± 0,01 #+
SIVD (mm)	0,38 ± 0,01	0,65 ± 0,05 *	0,42 ± 0,01 +	0,51 ± 0,03 *#+
PPVES (mm)	0,86 ± 0,05	1,09 ± 0,06 *	0,84 ± 0,04 +	1,11 ± 0,07 *#
PPVED (mm)	0,44 ± 0,02	0,83 ± 0,06 *	0,51 ± 0,03 +	0,68 ± 0,03 *#+

Fração de encurtamento (FEnc), diâmetro sistólico (DSFVE) e diastólico (DDFVE) finais do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular ao final da sístole (SIVS) e diástole (SIVD), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES) e diástole (PPVED) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF 90 dias após a realização das cirurgias infarto/sham. Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

5.2. Quantificação da área de infarto

Assim como as medidas ecocardiográficas, a quantificação da área infartada, por meio da técnica de histologia, demonstra o quão efetiva foi a técnica de infarto, representando quantitativa e qualitativamente o percentual de tecido contrátil necrosado.

A FIGURA 7A mostra o percentual da área de infarto nos grupos CO INF e KO INF (35±3 % e 39±4 %, respectivamente) em relação aos grupos CO SHAM e KO SHAM (0% de área infartada para ambos os grupos). As FIGURAS 7B e 7C ilustram a diferença entre os cortes histológicos dos corações INF em relação aos

corações SHAM. Este dado demonstra, mais uma vez, a eficácia da técnica de infarto utilizada.

FIGURA 7: Quantificação da área de infarto dos grupos CO SHAM (14), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (12) aos 90 dias pós-infarto (A). Cortes histológicos de corações SHAM (B) e de corações INF (C) independente do genótipo. As setas indicam a área infartada. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM e # vs. KO SHAM.

5.3. Pressão arterial e frequência cardíaca

Durante duas semanas que antecederam o sacrifício dos animais foi realizada a avaliação da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) de repouso por meio do método de pletismografia de cauda.

Como mostram as FIGURAS 8A e 8B, não houve diferença na PA e na FC entre os grupos CO SHAM e KO SHAM. O infarto do miocárdio também não alterou a PA e a FC dos animais CO INF e KO INF.

FIGURA 8: Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) de repouso dos grupos CO SHAM (6), CO INF (7), KO SHAM (7) e KO (7) INF 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$.

5.4. Noradrenalina e adrenalina plasmáticas

As concentrações de noradrenalina e adrenalina plasmáticas foram utilizadas como marcadores da atividade nervosa simpática periférica após os procedimentos cirúrgicos sham e infarto e para verificar se a inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos iria alterar a concentração de catecolaminas circulantes.

O grupo KO SHAM não apresentou diferença nos valores de noradrenalina (FIGURA 9A) e adrenalina (FIGURA 9B) plasmáticas em relação ao grupo CO SHAM o que demonstra que a inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos não

altera a concentração de catecolaminas circulantes. Contudo, o infarto foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina nos animais CO INF e KO INF, quando comparados aos grupos CO SHAM e KO SHAM.

FIGURA 9: Concentração plasmática de noradrenalina e adrenalina dos grupos CO SHAM (10), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (9 em A e 8 em B) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM e # vs. KO SHAM.

5.5. Massas teciduais

5.5.1. Massa corporal

Não houve diferença significativa na massa corporal dos animais KO SHAM em relação aos animais CO SHAM e o infarto também não alterou a massa corporal dos animais CO INF e KO INF (TABELA 3).

5.5.2. Massa do coração, massa do pulmão úmido e razão massa úmida/massa seca do pulmão

Os animais KO SHAM apresentaram menor massa cardíaca corrigida pela massa corporal quando comparados com os animais CO SHAM (TABELA 3).

Por outro lado, o infarto aumentou a massa relativa do coração dos grupos CO INF e KO INF, caracterizando, em concordância com os dados ecocardiográficos, um quadro de remodelamento cardíaco. É interessante notar que, embora o aumento da massa cardíaca tenha sido maior nos animais KO INF do que nos animais CO INF, a massa relativa do coração do grupo KO INF ainda foi menor que a do grupo CO INF (TABELA 3).

Além disso, não houve diferenças entre os grupos em relação à massa úmida/massa seca do pulmão (TABELA 3), indicando que a disfunção ventricular constatada nestes animais (como visto no item 5.1) não foi acompanhada de edema pulmonar, característica da IC congestiva.

5.5.3. Massa dos músculos sóleo e plantar e razão massa úmida/massa seca do músculo tibial anterior

A massa úmida do músculo sóleo foi menor nos animais KO SHAM em relação aos animais CO SHAM, não havendo diferença na massa úmida do músculo plantar entre esses dois grupos (TABELA 3). O infarto do miocárdio não alterou as massas dos músculos sóleo e plantar dos animais CO INF e KO INF (TABELA 3).

Os grupos SHAM e INF também não apresentaram diferenças significantes na razão massa úmida/massa seca do músculo tibial anterior (TABELA 3).

5.5.4. Massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal

Como demonstrado na TABELA 3, os animais KO SHAM apresentaram maior massa relativa do tecido adiposo epididimal em relação aos animais CO SHAM e o infarto do miocárdio reduziu significativamente a massa deste tecido nos grupos CO INF e KO INF em relação aos controles CO SHAM e KO SHAM. No entanto, estas diferenças não foram observadas no tecido adiposo retroperitoneal.

TABELA 3: Massas teciduais

	CO		KO	
	SHAM (n=14)	INF (n=11)	SHAM (n=14)	INF (n=12)
Massa corporal (g)	33 ± 1	32 ± 2	33 ± 1	31 ± 1
Massa relativa do coração (mg/g)	3,8 ± 0,1	5,8 ± 0,3 *	3,0 ± 0,1 *+	5,2 ± 0,4 #+
Massa relativa do pulmão úmido (mg/g)	5,6 ± 0,1	7,1 ± 0,8 *	5,7 ± 0,3	7,8 ± 0,6 #*
Razão massa úmida:seca pulmão	4,5 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1 +	4,6 ± 0,2
Massa relativa dos músculos				
Sóleo (mg/g)	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,01 *+	0,20 ± 0,01
Plantar (mg/g)	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,02
Razão massa úmida:seca tibial anterior	3,90 ± 0,09	3,87 ± 0,09	3,73 ± 0,03	3,93 ± 0,09
Massa relativa dos tecidos adiposos				
Epididimal (mg/g)	16,2 ± 1,4	10,1 ± 0,7 *	22,2 ± 1,8 *+	17,3 ± 2,1 #+
Retroperitoneal (mg/g)	7,3 ± 1,1	3,9 ± 0,5	10,4 ± 1,6 +	8,3 ± 1,4 +
<u>Massa corporal, massa do coração corrigida pela massa corporal, massa úmida do pulmão corrigida pela massa corporal, razão massa úmida/massa seca do pulmão, massas dos músculos sóleo e plantar corrigidas pela massa corporal, razão massa úmida/massa seca do músculo tibial anterior e massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal corrigida pela massa corporal dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF. Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média com significância de p≤0,05, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.</u>				

5.6. Tolerância à realização de esforço físico

Noventa dias pós-cirurgias, os animais foram submetidos ao teste progressivo máximo em esteira rolante a fim de verificar se o modelo de infarto proposto seria capaz de induzir intolerância ao esforço físico, uma vez que, como descrito anteriormente, a redução da tolerância ao esforço físico é considerada um sinal clínico da insuficiência cardíaca e está diretamente relacionada às alterações na musculatura esquelética.

Como demonstrado na FIGURA 10, os animais dos grupos KO SHAM apresentam desempenho físico significativamente maior que os animais do grupo CO SHAM (831 ± 39 m vs. 638 ± 22 m). Além disso, a FIGURA 10 mostra a queda significativa da tolerância ao esforço físico nos animais CO INF e KO INF em relação aos grupos CO SHAM e KO SHAM, sendo que esta queda foi mais acentuada no grupo KO INF (queda de 49% para KO INF vs. queda de 30% para CO INF).

FIGURA 10: Distância percorrida em metros 90 dias após as cirurgias pelos grupos CO SHAM (14), CO INF (11), KO SHAM (14) e KO INF (12). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

5.7. Avaliação *in vivo* da função muscular esquelética

5.7.1. Rota Rod

A FIGURA 11A demonstra que, assim como no teste de tolerância ao esforço físico, os animais KO SHAM possuem um melhor desempenho no teste Rota Rod quando comparados aos animais CO SHAM.

O infarto não alterou a funcionalidade da musculatura esquelética dos grupos CO INF e KO INF.

5.7.2. Deambulação

No teste de deambulação, o grupo KO SHAM não apresentou diferença na razão comprimento da passada/comprimento naso-anal em relação ao grupo CO SHAM.

De maneira diferente do teste Rota Rod, o infarto diminuiu o comprimento da passada somente nos animais KO INF quando comparados aos animais KO SHAM (FIGURA 11B).

FIGURA 11: Tempo em segundos atingido no teste Rota Rod (A) e comprimento da passada corrigida pelo comprimento naso-anal (B) 90 dias após as cirurgias pelos grupos CO SHAM (10), CO INF (9 em A e 11 em B), KO SHAM (12) e KO INF (11). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

5.8. Glicose plasmática e conteúdo de glicogênio muscular esquelético

A FIGURA 12A mostra que a concentração de glicose no plasma sanguíneo dos animais KO SHAM é menor em relação aos animais CO SHAM. Além disso, o infarto do miocárdio não alterou a glicemia dos grupos CO INF e KO INF.

Em contrapartida, o grupo KO SHAM apresentou maior estoque de glicogênio na porção branca do músculo gastrocnêmio em comparação ao grupo CO SHAM e o infarto reduziu significativamente o conteúdo de glicogênio muscular em ambos os grupos CO INF e KO INF (FIGURA 12B).

FIGURA 12: Concentração da glicose plasmática (A) e conteúdo de glicogênio muscular (B) 90 dias após as cirurgias dos grupos CO SHAM (9), CO INF (10 em A e 8 em B), KO SHAM (12 em A e 9 em B) e KO INF (10 em A e 8 em B). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

5.9. Caracterização fenotípica da musculatura esquelética

A caracterização fenotípica da musculatura esquelética foi realizada para verificar possíveis alterações consequentes da cirurgia de infarto e do genótipo β_2 KO. Para isso, foram executadas as análises de distribuição de fibras musculares, a razão capilar/fibra muscular e a área de secção transversa das fibras musculares dos músculos sóleo e plantar.

5.9.1. Distribuição das fibras musculares

Como pode ser observado na FIGURA 13, os animais KO SHAM apresentaram maior percentual de fibras do tipo I nos músculos plantar (A) e sóleo (B) e menor percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar e menor percentual de fibras do tipo IIA no músculo sóleo em relação ao grupo CO SHAM.

Em contrapartida, os animais KO INF apresentaram diminuição no percentual de fibras do tipo I nos músculos sóleo e plantar e aumento no percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar e aumento no percentual de fibras do tipo IIA no músculo sóleo em relação ao grupo KO SHAM. A mesma resposta foi encontrada no grupo

CO INF com diferenças significantes somente para o aumento do percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar e para a diminuição do percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo, quando comparados ao grupo CO SHAM. Esses dados corroboram achados da literatura, que mostram mudança no perfil de distribuição de fibras da musculatura esquelética de pacientes com IC para um fenótipo mais glicolítico (LIPKIN et al., 1988; HAMBRECHT et al., 1997).

O grupo CO INF apresentou aumento no percentual de fibras intermediárias no músculo sóleo em relação ao seu grupo controle e o grupo KO SHAM apresentou menor percentual deste tipo de fibra, também no músculo sóleo, quando comparado ao grupo CO INF.

FIGURA 13: Distribuição das fibras do tipo I, tipo IIA, tipo IIB e intermediárias, nos músculos plantar (A) e sóleo (B) dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF. As significâncias encontram-se acima das barras de erro.

5.9.2. Capilarização

Conforme mostra a FIGURA 14, os animais KO SHAM possuem maior capilarização dos músculos plantar (A) e sóleo (B) em relação ao grupo CO SHAM, e este dado se associa com o maior percentual de fibras oxidativas e maior tolerância ao esforço físico encontrados neste mesmo grupo (itens 5.9.1 e 5.6). Com a cirurgia de infarto, houve rarefação capilar em ambos os grupos CO e KO, nos dois tipos de músculos, e esta rarefação capilar foi mais pronunciada nos animais KO INF do que nos animais CO INF (queda de 35% para KO INF vs. queda de 26% para CO INF no músculo plantar e queda de 32% para KO INF vs. queda de 22% para CO INF no músculo sóleo).

FIGURA 14: Razão do número de capilares por número de fibras musculares nos músculos plantar (A) e sóleo (B) dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

5.9.3. Área de secção transversa das fibras musculares

Conforme mostra a FIGURA 15, o grupo KO SHAM apresentou diminuição da área de secção transversa das fibras dos tipos IIA, intermediárias e IIB no músculo plantar e das fibras dos tipos I e IIA no músculo sóleo, em relação aos animais CO SHAM. Este dado corrobora a diminuição da massa do músculo sóleo nos animais

KO SHAM, como citado anteriormente (item 5.5.3), e demonstra que animais com inativação gênica para o receptor β_2 -adrenérgico possuem um fenótipo muscular esquelético mais atrofiado quando comparados aos seus animais controles.

Também podemos observar na FIGURA 15 que os animais KO INF tiveram diminuição da área de seção transversa das fibras dos tipos I, IIA, IIB e intermediárias no músculo plantar e das fibras dos tipos I, IIA e intermediárias no músculo sóleo em relação ao seu grupo KO SHAM. Em contrapartida, embora o grupo CO INF tenha apresentado diminuição na área de secção das fibras do tipo I e IIA no músculo plantar e das fibras do tipo I e intermediárias no músculo sóleo em relação ao grupo CO SHAM, essa diferença não foi significativa.

FIGURA 15: Área de secção transversa (AST) das fibras do tipo I (A), tipo IIA (B), intermediárias (C) e tipo IIB (D) no músculo plantar, e das fibras do tipo I (E), tipo IIA (F), intermediárias (G) no músculo sóleo dos grupos CO SHAM (6), CO INF (6), KO SHAM (5) e KO INF (5) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM, + vs. CO INF e \$ vs. KO SHAM, CO INF e CO SHAM.

5.10. Caracterização das vias de sinalização envolvidas na síntese e na degradação proteica

Após a avaliação do fenótipo muscular esquelético e da observação da presença de atrofia muscular nos animais KO INF, foram realizados experimentos com a finalidade de investigar algumas vias relacionadas à síntese e à degradação proteicas que poderiam estar associadas com as alterações observadas na massa muscular esquelética. As vias avaliadas foram a via de síntese Akt/mTOR e o sistema ubiquitina-proteassoma envolvido na degradação proteica. A escolha pela avaliação de tais vias justifica-se por estas serem as principais vias relacionadas com a regulação da massa muscular esquelética (SOLOMON e GOLDBERG, 1996; SANDRI, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos neste tecido é capaz de modular as vias Akt/mTOR e ubiquitina-proteassoma (LOPEZ-ILASACA et al., 1997; MURGA et al., 1998; MURGA, FUKUHARA e GUTKIND, 2000; GONCALVES et al., 2009).

Os ensaios foram realizados nos músculos plantares de todos os grupos estudados, uma vez que os músculos glicolíticos parecem apresentar maior atrofia muscular do que músculos oxidativos em doenças inflamatórias, como a IC (ACHARYYA et al., 2004; LI et al., 2007) e os músculos com características glicolíticas também são mais responsivos aos estímulos anabólicos promovidos pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos (SATO et al., 2011).

5.11. Via de sinalização Akt/mTOR

Para caracterizar a participação da via de síntese proteica no fenótipo muscular esquelético, foram realizadas as expressões proteicas de Akt1, p-Akt (ser 473), p70S6K, 4E-BP1 e p-4E-BP1 (thr 70 e thr 37/46).

Como pode ser observado na FIGURA 16, não houve diferença na expressão de nenhuma proteína relacionada à síntese proteica entre os grupos KO SHAM e CO SHAM. Somente a expressão da proteína p-4E-BP1 (thr37/46) foi maior nos animais KO SHAM em relação aos animais CO INF.

Em relação ao infarto, os animais CO INF não apresentaram alteração na expressão das proteínas relacionadas à síntese proteica. Em contrapartida, os animais KO INF apresentaram uma tendência de diminuição da expressão das proteínas p-Akt e p-4E-BP1 (thr37/46) quando comparados aos animais KO SHAM (FIGURAS 16B e 16F).

5.12. Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma

Para caracterizar a participação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma no fenótipo muscular esquelético, foram realizados o ensaio de atividade do proteassoma e as expressões proteicas de FoxO3a, p-FoxO3a (ser 253), atrogin-1, MuRF-1 e a expressão de proteínas ubiquitinadas.

Não houve diferença na expressão das proteínas relacionadas à degradação proteica entre os grupos KO SHAM e CO SHAM, conforme mostra a FIGURA 17. No entanto, os animais KO SHAM apresentaram menor atividade do proteassoma quando comparados aos animais CO SHAM e CO INF (FIGURA 17F).

O infarto do miocárdio aumentou significativamente a expressão proteica de atrogin-1 no grupo CO INF em relação ao grupo CO SHAM, porém não alterou a atividade do proteassoma e a expressão das outras proteínas envolvidas na via de degradação proteica. Já em relação aos animais β_2 KO, o infarto aumentou a expressão de atrogin-1 e de proteínas ubiquitinadas e aumentou a atividade do proteassoma quando comparadas ao grupo KO SHAM. A expressão de MuRF-1 também aumentou no grupo KO INF somente em relação ao grupo CO SHAM, não sendo significativamente diferente dos valores encontrados no grupo KO SHAM. Além disso, como mostra a FIGURA 17B, os animais KO INF apresentaram uma tendência para a diminuição da fosforilação da proteína FoxO3a.

FIGURA 17: Expressão proteica de FoxO3a (A), p-FoxO3a ser253 (B), atrogin-1 (C), MuRF-1 (D), proteínas poliubiquitinadas (Poli-Ub) (E) e atividade do 26S-proteassoma no sítio da quimiotripsina (F) no músculo plantar dos grupos CO SHAM (8), CO INF (7), KO SHAM (8) e KO INF (8) 90 dias após as cirurgias. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média com significância de $p \leq 0,05$, sendo * vs. CO SHAM, # vs. KO SHAM e + vs. CO INF.

O QUADRO 2 ilustra o resumo dos principais resultados obtidos no estudo, demonstrando separadamente o efeito da inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos (efeito do genótipo) e da cirurgia de infarto do miocárdio nos animais CO e β_2 KO.

QUADRO 2: Resumo dos principais resultados obtidos no estudo.

Principais resultados	Efeito do genótipo	Efeito do infarto	
	KO vs. CO	CO	KO
Massa corporal	↔	↔	↔
Função ventricular	↔	↓	↓
Massa cardíaca	↓	↑	↑
Pressão arterial	↔	↔	↔
Frequência cardíaca	↔	↔	↔
Catecolaminas plasmáticas	↔	↑	↑
Massa úmida do pulmão	↔	↑	↑
Razão massa úmida:massa seca pulmão	↔	↔	↔
Massa tecido adiposo epididimal	↑	↓	↓
Tolerância ao esforço físico	↑	↓	↓
Conteúdo de glicogênio muscular	↑	↓	↓
% fibras musculares oxidativas	↑	↓	↓
% fibras musculares glicolíticas	↓	↑	↑
Capilarização	↑	↓	↓
AST das fibras musculares	↓	↔	↓
Expressão de p-Akt (ser473)	↔	↔	↓§
Expressão de p-4E-BP1 (thr37/46)	↔	↔	↓§
Expressão de p-FoxO3a (ser253)	↔	↔	↓§
Expressão de atrogina-1	↔	↑	↑
Expressão de proteínas poliubiquitinadas	↔	↔	↑
Atividade do proteassoma	↓	↔	↑

Efeitos do genótipo (KO SHAM vs. CO SHAM) e da cirurgia de infarto do miocárdio nos animais CO INF e KO INF. ↔ sem alteração, ↑ aumento e ↓ diminuição, sendo que § significa tendência de alteração.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram pela primeira vez a participação dos receptores β_2 -adrenérgicos nas alterações da musculatura esquelética induzidas pelo infarto do miocárdio em camundongos. A discussão destes dados será apresentada nos tópicos a seguir.

6.1. Caracterização fenotípica do modelo de infarto do miocárdio

Neste tópico, será discutida a caracterização do modelo de infarto do miocárdio nos animais controles e β_2 KO. O modelo de infarto do miocárdio foi escolhido pois, dentre as etiologias da insuficiência cardíaca, a etiologia isquêmica é a mais prevalente em países desenvolvidos ocidentais e no Brasil (BOCCHI et al., 2009; LINDENFELD et al., 2010)

6.1.1. Medidas ecocardiográficas e massa cardíaca

Foram avaliadas por ecocardiograma as alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes da cirurgia de infarto nos animais controles e β_2 KO aos 90 dias pós-infarto. Como demonstrado nos resultados, os animais CO INF e KO INF apresentaram diminuição da função ventricular esquerda, representada pela fração de encurtamento, e apresentaram aumento da cavidade ventricular esquerda e espessamento da parede posterior do ventrículo esquerdo e do septo interventricular, caracterizando um quadro de remodelamento cardíaco. Tais alterações morfofuncionais têm sido observadas em modelos animais pós-infarto do miocárdio (YANG et al., 2002) e em pacientes com IC (WISLOFF et al., 2007; KARDYS et al., 2010). De fato, a utilização do exame ecocardiográfico para a avaliação morfofuncional cardíaca é amplamente utilizada e recomendada na clínica da insuficiência cardíaca (FRIGERIO e ROUBINA, 2005) e em estudos com animais de experimentação (MARTINEZ et al., 2011). As alterações ecocardiográficas foram acompanhadas de aumento na massa cardíaca corrigida pela massa corporal nos

animais CO e KO infartados, demonstrando mais uma vez a presença de remodelamento cardíaco nestes animais.

A inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos não provocou alteração funcional cardíaca nos animais β_2 KO, segundo a avaliação ecocardiográfica. Sabe-se que os receptores β_1 -adrenérgicos são os mais expressos no coração e por esta razão também são chamados de “os receptores β -adrenérgicos cardíacos”, pois a sua ativação *in vivo* promove aumento da frequência cardíaca (cronotropismo), da força de contração do coração (inotropismo) e da taxa de relaxamento cardíaco (lusitropismo) quando em contato com um agonista (BERNSTEIN, 2002; BRUM et al., 2006). No entanto, os receptores β_2 -adrenérgicos também são expressos no coração na razão 20:80 em relação aos receptores β_1 -adrenérgicos e em algumas espécies podem colaborar para o cronotropismo e o inotropismo cardíacos (BRODDE, 1991; XIAO e LAKATTA, 1993). De fato, estudos demonstraram que animais com inativação gênica apenas para os receptores β_1 -adrenérgicos apresentaram aumento atenuado de frequência cardíaca e força de contração do miocárdio em relação aos animais controles quando estimulados com isoproterenol, ao passo que os animais com inativação gênica apenas para os receptores β_2 -adrenérgicos apresentaram respostas normais e equivalentes aos animais controles mediante o mesmo estímulo (ROHRER et al., 1999; BERNSTEIN, 2002). Estes dados confirmam a maior participação dos receptores β_1 -adrenérgicos no cronotropismo e inotropismo cardíacos em relação aos receptores β_2 -adrenérgicos e justificam a não alteração da função cardíaca que foi observada nos animais KO SHAM em relação aos animais CO SHAM.

Em relação aos parâmetros morfológicos cardíacos, não foram observadas diferenças significantes entre os animais KO SHAM e CO SHAM na avaliação ecocardiográfica. Entretanto, a massa cardíaca corrigida pela massa corporal dos animais KO SHAM foi significativamente menor em relação aos animais CO SHAM. Este fato pode ser explicado uma vez que a estimulação dos receptores β -adrenérgicos, principalmente os do subtipo β_2 , possui um importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento estrutural do miocárdio (BERNSTEIN,

2002) e a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos poderia prejudicar este processo nos animais β_2 KO.

6.1.2. Área de infarto

A disfunção ventricular esquerda apresentada pelos animais CO INF e KO INF pode ter sido consequência da perda exacerbada de tecido contrátil cardíaco decorrente do processo isquêmico crônico causado pelo infarto do miocárdio. Os grupos CO INF e KO INF apresentaram médias de área infartada de 35% e 39%, respectivamente, não sendo estes valores diferentes entre os dois grupos, demonstrando que a média de área infartada foi igual para os animais CO e KO infartados, o que sugere que o genótipo possivelmente não interferiu na extensão da área infartada.

O tamanho da área infartada pode determinar a capacidade do coração de contrair e ejetar sangue para os tecidos e isso é variável entre as espécies. Por exemplo, áreas infartadas maiores que 20% são consideradas grandes em cães e áreas maiores que 30% podem culminar em arritmias fatais nestes mesmos animais (HOOD, 1970; KUMAR et al., 1970). No entanto, o modelo de infarto do miocárdio em roedores é capaz de gerar diferentes tamanhos de infartos sem provocar disfunção cardíaca ou comprometimentos mais graves que poderiam levar o animal a desenvolver IC. Por este motivo, PFEFFER et al. (1979) realizaram um estudo com ratos onde, a partir de parâmetros hemodinâmicos e funcionais, consideraram que infartos menores que 30% eram pequenos, infartos entre 31% e 46% eram moderados e infartos maiores que 46% eram considerados grandes. GAO et al. (2005) utilizaram a mesma classificação para determinar o tamanho das áreas infartadas de camundongos. Segundo estes estudos, as médias das áreas infartadas dos animais CO INF e KO INF encontram-se na classe dos infartos de tamanho moderado, onde os valores hemodinâmicos basais são normais e a função cardíaca é reduzida, exatamente como observado na presente dissertação. Outros estudos que utilizaram a técnica de infarto do miocárdio em camundongos também observaram, em média, tamanhos de infartos moderados, por volta de 40% (WANG

et al., 2006; SHIOURA, GEENEN e GOLDSPINK, 2007; MONTECUCCO et al., 2011).

É importante ressaltar que o tamanho dos infartos observados nos animais CO INF e KO INF foi suficiente para promover remodelamento cardíaco nestes animais, como apresentado na TABELA 2 e discutido no tópico anterior.

6.1.3. Noradrenalina e adrenalina circulantes

A disfunção cardíaca e o remodelamento do miocárdio foram acompanhados de aumento na concentração de noradrenalina e adrenalina plasmáticas nos animais CO INF e KO INF em relação aos seus respectivos grupos SHAM, corroborando dados da literatura que mostram aumento de catecolaminas circulantes em animais com IC induzida pelo infarto do miocárdio (LYMPEROPOULOS et al., 2010) e em modelo genético de IC por hiperatividade simpática de nosso laboratório (BACURAU et al., 2009). A hiperativação do sistema nervoso simpático é um marcador clássico da IC e está diretamente relacionada à piora do prognóstico e à diminuição da sobrevida dos pacientes (TRIPOSKIADIS et al., 2009), e a concentração plasmática de noradrenalina e adrenalina tem sido utilizada na prática clínica como um indicador da atividade simpática periférica (ESLER et al., 1986; ESLER et al., 1995).

Apesar de ambos os grupos infartados terem apresentado aumento na concentração das catecolaminas plasmáticas em relação aos seus respectivos grupos SHAM, o grupo KO INF apresentou um menor percentual de aumento quando comparado ao grupo CO INF nas concentrações plasmáticas de noradrenalina (37% vs. 70%, respectivamente) e adrenalina (111% vs. 262%, respectivamente). A ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos nos animais KO INF pode ter prejudicado a liberação de noradrenalina no terminal nervoso simpático, uma vez que esses receptores localizados nestes terminais participam do controle da liberação de noradrenalina por meio de uma alça de retroalimentação positiva (SCHMIDT et al., 1984; DEEGAN et al., 1995). Consequentemente, essa menor liberação de noradrenalina pelo terminal nervoso simpático pode ter influenciado a

menor liberação de adrenalina e também de noradrenalina pela glândula adrenal, considerando que esta liberação é mediada pelo sistema nervoso simpático.

Embora os receptores β_2 -adrenérgicos tenham participação na liberação de noradrenalina no terminal nervoso simpático e conseqüentemente de adrenalina e noradrenalina pela glândula adrenal, os níveis de catecolaminas circulantes não foram diferentes entre os grupos CO SHAM e KO SHAM, demonstrando que a inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos não alterou a concentração das mesmas em condições basais. Uma possível explicação para isso é que a liberação das catecolaminas é mediada e é dependente de vários outros fatores que poderiam estar compensados na ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos a fim de manter a homeostase do animal.

6.1.4. Razão massa úmida/massa seca do pulmão

Além da disfunção cardíaca e da hiperatividade simpática, a presença de edema pulmonar é um sinal clássico de IC congestiva, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (REMO, 2005; NISHI et al., 2006; FOX et al., 2007), pois reflete a incapacidade do ventrículo esquerdo em bombear sangue devido ao prejuízo da função contrátil cardíaca (FIGUEROA e 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.

O teor de água nos pulmões é calculado por meio da razão entre a massa úmida do pulmão e a massa seca do pulmão. Embora os animais CO e KO infartados tenham apresentado aumento dos valores da razão massa úmida/massa seca do pulmão em relação aos seus respectivos grupos controle, esse aumento não foi estatisticamente significativo. Esse resultado sugere que, embora a disfunção cardíaca seja grave e associada a remodelamento cardíaco típico da IC, não foram observados sinais de IC congestiva nos animais estudados.

Entretanto, é possível notar que houve aumento dos valores isolados das massas úmidas dos pulmões corrigidas pelas massas corporais dos animais CO INF e KO INF em relação aos seus controles SHAM. Estes resultados corroboram dados da literatura que também observaram aumento da massa úmida dos pulmões de ratos infartados, sem diferença significativa na razão massa úmida/massa seca do pulmão (JASMIN et al., 2004; CHABOT et al., 2011). Nesse sentido, é importante destacar que vários estudos na literatura utilizam somente a massa úmida do pulmão corrigida pela massa corporal ou pelo comprimento da tíbia como indicador de congestão pulmonar em modelos animais (FINSEN, CHRISTENSEN e SJAASTAD, 2005; MATSUSHIMA et al., 2006).

Além disso, a literatura demonstra que após o infarto do miocárdio a massa seca dos pulmões também pode aumentar (CHABOT et al., 2011), possivelmente por consequência de um remodelamento pulmonar que é caracterizado por deposição de colágeno e reticulina, espessamento dos septos alveolares e proliferação de miofibroblastos (KAPANCI et al., 1990; JASMIN et al., 2003; JASMIN et al., 2004; CHABOT et al., 2011). No presente estudo, os animais CO INF e KO INF apresentaram aumento dos valores absolutos das massas secas dos pulmões corrigidas pela massa corporal em relação aos seus respectivos grupos SHAM ($1,48 \pm 0,16$ vs. $1,26 \pm 0,05$ para CO INF vs. CO SHAM e $1,75 \pm 0,17$ vs. $1,40 \pm 0,11$ para KO INF vs. KO SHAM), embora estes aumentos não tenham sido estatisticamente significativos. Esse aumento da massa seca dos pulmões pós-infarto poderia fazer com que os valores da razão massa úmida/massa seca dos pulmões não fossem diferentes entre os grupos estudados, como já demonstrado por JASMIN et al. (2004).

6.1.5. Parâmetros hemodinâmicos

Apesar da disfunção cardíaca observada nos animais CO e KO infartados, os valores de pressão arterial (PA) de repouso se mantiveram inalterados. Tal comportamento da PA é comumente observado em pacientes portadores de IC, visto que o aumento da resistência vascular periférica pela hiperativação simpática é acompanhado por baixo débito cardíaco, proporcionando níveis pressóricos normais

nesses indivíduos (NEGRAO et al., 2000; SANTOS et al., 2005). Considerando que a PA é uma variável hemodinâmica dependente do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, é possível que o mesmo tenha ocorrido com os animais CO e KO infartados do presente estudo, uma vez que, como discutido acima, estes apresentam disfunção ventricular (que poderia levar à diminuição do débito cardíaco), acompanhada de aumento nas concentrações de noradrenalina e adrenalina plasmáticas, aumentando assim a resistência periférica.

Assim como ocorreu com a PA, a frequência cardíaca (FC) de repouso também não foi alterada com o infarto do miocárdio nos animais CO e KO. MILL, VASSALLO e LEITE (1991) demonstraram, a partir de um curso temporal sobre o comportamento da FC após a cirurgia de infarto em ratos, que a FC aumenta um dia após o infarto e que ao longo dos dias os valores vão decaindo, até que duas semanas pós-infarto os valores de FC se normalizam. É possível que o mesmo tenha ocorrido nos camundongos infartados deste estudo.

Os animais KO SHAM não apresentaram diferenças quanto aos valores de FC e PA de repouso em relação aos animais CO SHAM, corroborando os dados de CHRUSCINSKI et al. (1999) que também avaliaram a FC e a PA basais nos animais β_2 KO. Os mesmos autores observaram que em situações estimuladas, como a administração de isoproterenol e durante a realização de exercício físico, os animais β_2 KO apresentaram aumento da FC na mesma magnitude que os animais controles (que expressavam os receptores β_2 -adrenérgicos), demonstrando que o cronotropismo cardíaco é mediado principalmente pelos receptores β_1 -adrenérgicos, subtipo de receptor β -adrenérgico mais expresso no coração. Portanto, a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos, tanto em situação basal como em situações estimuladas, não interfere no comportamento da FC nos animais β_2 KO.

Por outro lado, em relação à PA, a mesma manobra de infusão de isoproterenol promoveu hipotensão nos animais controles, o que não foi observado de forma significativa nos animais β_2 KO. Embora em menor magnitude, os animais β_2 KO também apresentaram diminuição da PA após a administração de isoproterenol, que pode ser atribuída à ativação de outros subtipos de receptores β -adrenérgicos presentes no endotélio vascular. Durante a realização da sessão de exercício físico, o aumento de PA foi muito maior nos animais β_2 KO do que nos

animais controles. A partir destes resultados, CHRUSCINSKI et al. (1999) demonstraram que os receptores β_2 -adrenérgicos desempenham um importante papel no controle da resistência vascular periférica.

Dessa forma, a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos pode não estar envolvida no controle da PA em condições basais, uma vez que o comportamento da PA dos animais β_2 KO foi diferente do comportamento da PA dos animais controles apenas com a administração de isoproterenol e durante a sessão de exercício. Além disso, é importante considerar que os animais β_2 KO não expressam os receptores β_2 -adrenérgicos desde a concepção e, por isso, podem haver mudanças compensatórias que permitem a manutenção da PA de repouso nesses animais.

6.2. Composição corporal

Foram utilizados parâmetros indiretos para a avaliação da composição corporal nos grupos estudados no presente estudo, que consistiram da pesagem do animal e da pesagem dos tecidos musculares e adiposos dissecados após o sacrifício.

Conforme apresentado na seção de resultados, o infarto do miocárdio não alterou as massas corpóreas e as massas dos músculos sóleo e plantar dos grupos estudados aos 90 dias após o procedimento cirúrgico. Embora a avaliação da massa dos músculos 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). Por isso, para melhor avaliar o fenótipo muscular desses animais, foi utilizada a técnica de histoquímica que é mais sensível e que permitiu uma melhor avaliação da massa muscular por meio da determinação da área de secção transversa de cada fibra muscular (resultados discutidos adiante).

No entanto, o infarto diminuiu drasticamente a massa do tecido adiposo epididimal nos animais CO e KO infartados, o que pode ser explicado pelo aumento das concentrações de noradrenalina e adrenalina circulantes. Considerando que o tecido adiposo apresenta alta densidade de receptores β -adrenérgicos, quando

ativados pelas catecolaminas plasmáticas estes receptores promovem o aumento da atividade lipolítica, diminuindo consequentemente a massa do tecido adiposo (BOWERS et al., 2005). É interessante destacar que a perda da massa do tecido adiposo epididimal foi mais acentuada nos animais CO INF do que nos animais KO INF, e isto provavelmente se deve à menor densidade de receptores β -adrenérgicos no tecido adiposo dos animais β_2 KO, uma vez que estes não expressam os receptores β_2 -adrenérgicos.

Além disso, os animais KO SHAM apresentaram maior massa do tecido adiposo epididimal em relação aos animais CO SHAM, o que sugere que os animais β_2 KO possam ter uma menor atividade lipolítica basal por causa da ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos. Este dado, juntamente com a menor perda de massa adiposa no grupo KO INF discutida acima, aponta para a importante participação do receptor β_2 -adrenérgico no processo de lipólise, mesmo sendo o subtipo β_3 o receptor β -adrenérgico mais expresso no tecido adiposo (MCNEEL e MERSMANN, 1999; LYNCH e RYALL, 2008).

6.3. Parâmetros metabólicos

Foram avaliados como parâmetros metabólicos o conteúdo de glicogênio muscular na porção branca do gastrocnêmio e as concentrações de glicose plasmática.

Como descrito anteriormente nos resultados, os animais KO SHAM apresentaram maior estoque de glicogênio muscular quando comparados aos animais CO SHAM. Esta resposta era esperada, uma vez que a ativação dos receptores β -adrenérgicos estimula a glicogenólise, ou seja, a quebra de glicogênio muscular em glicose (GROSS, MAYER e LONGSHORE, 1976). Portanto, com a inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos, o estímulo para a glicogenólise no músculo esquelético dos animais β_2 KO seria menor, resultando em maiores estoques de glicogênio muscular. Os animais KO SHAM também apresentaram menores valores de glicose circulante em relação aos animais CO SHAM. A baixa glicemia encontrada nos animais β_2 KO pode ser consequência de uma maior captação de glicose pelos tecidos muscular esquelético e adiposo, decorrente de

uma maior sensibilidade à insulina, levando-se em consideração que o estímulo β -adrenérgico inibe a captação de glicose dependente de insulina nestes tecidos (LIU e STOCK, 1995; NIKLASSON, HOLMANG e LONNROTH, 1998; ASENSIO et al., 2005).

O infarto do miocárdio não alterou os níveis de glicose circulante nos grupos CO INF e KO INF. Entretanto, os animais CO e KO infartados apresentaram queda do conteúdo de glicogênio muscular, corroborando dados da literatura que também observaram diminuição do conteúdo de glicogênio muscular em pacientes com IC, associada a elevadas taxas de glicogenólise (SULLIVAN, GREEN e COBB, 1990). Os possíveis mecanismos envolvidos na diminuição do conteúdo de glicogênio muscular na IC incluem menor aporte de substratos energéticos para a musculatura esquelética associada à redução da perfusão sanguínea, alterações intrínsecas do fenótipo muscular esquelético a favor de um metabolismo mais glicolítico e níveis elevados de catecolaminas circulantes que estimulam a degradação do glicogênio. Todos esses fatores foram observados nos animais CO INF e KO INF estudados na presente dissertação.

É importante ressaltar que, embora ambos os grupos CO INF e KO INF tenham apresentado uma redução de 43 microgramas de glicogênio por grama de tecido muscular em relação aos seus respectivos grupos controle, os animais CO INF apresentaram maior queda relativa do conteúdo de glicogênio muscular (56% para CO INF vs. CO SHAM) do que os animais KO INF (38% para KO INF vs. KO SHAM). Isto possivelmente se deve à menor responsividade da glicogenólise ao estímulo simpático (elevadas concentrações de adrenalina e noradrenalina induzidas pelo infarto) nos animais β_2 KO, já que os receptores β_2 -adrenérgicos medeiam a glicogenólise, como discutido acima.

6.4. Testes de desempenho físico

Os testes de desempenho físico incluem o teste de tolerância ao esforço físico e os testes Rota Rod e de deambulação, que permitem avaliar a funcionalidade da musculatura esquelética e a habilidade motora.

6.4.1. 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).

Como descrito anteriormente, a intolerância à realização de esforço físico na IC, que é caracterizada por redução na capacidade de realizar exercício físico dinâmico devido a sintomas como dispnéia ou fadiga periférica (RUBIM et al., 2006), é considerada um marcador clínico da IC e está diretamente relacionada às alterações na musculatura esquelética (MINOTTI et al., 1991; VOLTERRANI et al., 1994; HARRINGTON et al., 1997). 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.

No presente estudo, os animais CO e KO submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio apresentaram intolerância aos esforços físicos aos 90 dias pós-infarto, corroborando dados do nosso laboratório (ROLIM et al., 2006; BACURAU et al., 2009) e da literatura (RONDON et al., 2006; WISLOFF et al., 2007; ANTUNES-CORREA et al., 2011), os quais demonstram que modelos animais e humanos com IC possuem menor capacidade física aeróbica.

Esta diminuição da tolerância ao esforço físico observada nos animais controles e β_2 KO infartados pode ser explicada pela diminuição no percentual de fibras musculares oxidativas, aumento do percentual de fibras glicolíticas e diminuição da capilarização muscular, conforme demonstrado no item 5.9 e discutido no tópico seguinte, e também pela diminuição do conteúdo de glicogênio muscular, observadas nos grupos CO INF e KO INF.

Embora ambos os grupos CO e KO infartados tenham apresentado diminuição da tolerância ao esforço físico, a queda de desempenho nos animais KO INF foi mais acentuada que nos animais CO INF. Da mesma forma, os animais KO

INF apresentaram maior rarefação capilar do que os animais CO INF e também apresentaram atrofia muscular esquelética pós-infarto, não observada nos animais CO INF. Esse quadro de miopatia esquelética mais grave nos animais β_2 KO infartados pode ter contribuído para a maior queda da tolerância ao esforço nesses animais.

Além disso, é interessante ressaltar que o grupo β_2 KO SHAM possui um desempenho físico em esteira maior que o grupo CO SHAM, corroborando os dados de (CHRUSCINSKI et al., 1999). Esse estudo demonstrou que camundongos com inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos, embora não tivessem aumento significativo do consumo de oxigênio pico, apresentavam um quociente respiratório (QR) menor que o dos seus controles. O QR é um indicador do estado metabólico e da utilização de substrato; quanto maior é o valor do QR, maior é a mobilização de glicogênio, quanto menor é o valor do QR, maior é a mobilização de gordura (MCARDLE, KATCH e KATCH, 2011). Dessa forma, nos animais β_2 KO o consumo de oxigênio é destinado, em sua maior parte, à metabolização de lipídeos durante o exercício, assim, o glicogênio muscular seria conservado por mais tempo e poderia colaborar para o aumento da duração do exercício físico. De fato, como visto anteriormente, os animais KO SHAM apresentam maior estoque de glicogênio muscular em relação aos animais CO SHAM. Além disso, sabe-se que a ativação simpática durante o exercício promove a glicogenólise por meio dos receptores β -adrenérgicos (ISSEKUTZ, 1984; ROHRER et al., 1999). Com a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos, o animal β_2 KO poderia ter um prejuízo na mobilização de glicogênio muscular, levando à mobilização preferencial de gordura.

Outros mecanismos, mediados pela via de sinalização β_2 -adrenérgica, podem ser responsáveis pelo aumento de desempenho dos animais β_2 KO. Tem sido demonstrado que as catecolaminas circulantes liberadas durante o exercício físico estimulam a produção de lactato, possivelmente por meio dos receptores β_2 -adrenérgicos (ISSEKUTZ, 1984; ROHRER et al., 1999). Na ausência dos mesmos, o camundongo β_2 KO produziria menores concentrações de lactato, o que poderia aumentar a sua capacidade de se exercitar, retardando a instalação da fadiga muscular. O fenótipo muscular esquelético com características mais oxidativas observado nos animais KO SHAM deste estudo, como maior percentual de fibras do

tipo I, menor percentual de fibras do tipo IIA e IIB e maior capilarização também colaboram para o melhor desempenho físico dos animais β_2 KO.

6.4.2. Rota Rod e deambulação

Os testes de Rota Rod e deambulação foram utilizados a fim de estimar a força contrátil muscular e a coordenação motora dos animais estudados no presente estudo. O Rota Rod é um teste comportamental considerado padrão ouro para avaliar o efeito de doenças, da administração de drogas e de manipulações genéticas sobre a coordenação motora e também sobre a força muscular e a resistência à fadiga em roedores (RADLEY et al., 2007).

O infarto do miocárdio não alterou o tempo total atingido no Rota Rod pelos animais CO INF e KO INF em relação aos seus controles SHAM, demonstrando que a funcionalidade da musculatura esquelética não foi alterada pela cirurgia, quando avaliada por este teste. Entretanto, em relação ao teste de deambulação, adaptado em nosso laboratório (BUENO et al., 2010) a partir do estudo de KENNEL et al. (1996), houve diminuição do comprimento relativo da passada dos animais KO INF quando comparados aos animais KO SHAM, o que não foi observado nos animais CO INF. Este dado demonstra, mais uma vez, que o quadro de miopatia esquelética causado pela cirurgia de infarto encontra-se em estágio mais avançado nos animais β_2 KO do que nos animais controles.

Além disso, pode-se observar que os animais KO SHAM apresentaram maior desempenho no teste de Rota Rod quando comparados aos animais CO SHAM, o que corrobora o maior desempenho destes mesmos animais no teste de tolerância ao esforço físico, como discutido no item acima.

6.5. Caracterização do fenótipo muscular esquelético

6.5.1. Tipagem de fibras musculares esqueléticas

Como descrito nos resultados, os animais KO INF apresentaram diminuição no percentual de fibras do tipo I, oxidativas e resistentes à fadiga, nos músculos plantar e sóleo e aumento no percentual de fibras do tipo IIB e IIA, glicolíticas e menos resistentes à fadiga, nos músculos plantar e sóleo, respectivamente. A mesma resposta foi encontrada no grupo CO INF com diferenças significantes somente para o aumento do percentual de fibras do tipo IIB no músculo plantar e para a diminuição do percentual de fibras do tipo I no músculo sóleo, quando comparado ao grupo CO SHAM.

Esses resultados mostram que as alterações na distribuição de fibras decorrentes do infarto do miocárdio nos animais CO e KO ocorrem em direção às fibras glicolíticas, corroborando dados da literatura que demonstram que, dentre as modificações estruturais da musculatura esquelética observadas no desenvolvimento da IC, destacam-se as alterações no tipo de fibra muscular com redução da porcentagem de fibras do tipo I e aumento de fibras do tipo II, (MANCINI et al., 1989; SULLIVAN, GREEN e COBB, 1990; DREXLER et al., 1992; MANCINI et al., 1992).

Também é importante ressaltar que os animais KO SHAM apresentaram maior percentual de fibras oxidativas e menor percentual de fibras glicolíticas em ambos os músculos sóleo e plantar em relação ao grupo CO SHAM. Este dado pode ser entendido levando-se em consideração o fato de que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos faz com que as fibras musculares migrem de um perfil oxidativo para um perfil mais glicolítico (BRICOUT, SERRURIER e BIGARD, 2004; JONES et al., 2004; BURNISTON et al., 2007). Ou seja, na ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos e do estímulo simpático, a mudança dos tipos de fibras poderia estar na direção oposta, de fibras mais glicolíticas, como a do tipo IIB e IIA, para mais oxidativas, como a do tipo I. Além disso, possíveis mudanças no metabolismo do

animal β_2 KO poderiam contribuir para a construção de um fenótipo muscular mais oxidativo, como discutido nos itens 6.3 e 6.4.

6.5.2. Capilarização

A cirurgia de infarto promoveu rarefação capilar nos músculos sóleo e plantar em ambos os grupos CO INF e KO INF, corroborando mais uma vez os dados da literatura (LIPKIN et al., 1988; HAMBRECHT et al., 1997) e de nosso laboratório que demonstraram rarefação capilar em músculos esqueléticos de animais com IC (BACURAU et al., 2009). Além disso, esta rarefação capilar foi mais pronunciada nos animais KO INF do que nos animais CO INF, tanto no músculo plantar quanto no músculo sóleo. É interessante notar que a queda da capilarização nos animais CO e KO infartados e a rarefação capilar mais acentuada no grupo KO INF associam-se com os dados de tolerância ao esforço físico, onde foram observados menores valores de distância percorrida nos grupos infartados e queda mais pronunciada de desempenho nos animais KO INF, demonstrando que estes fatores estão fortemente associados.

Em relação aos grupos SHAM, os animais KO SHAM apresentaram maior capilarização dos músculos sóleo e plantar em relação ao grupo CO SHAM. Uma possível mudança no metabolismo e o fenótipo muscular mais oxidativo observado nos animais β_2 KO podem contribuir para o aumento da razão capilar/fibra muscular nestes animais. Em contrapartida, não se pode descartar a hipótese de que os animais β_2 KO possam apresentar algum grau de disfunção endotelial, considerando que os receptores β_2 -adrenérgicos colaboram para a vasodilatação periférica (FERRO et al., 2004; CICCARELLI et al., 2007), e que tal disfunção tenha provocado um aumento no número de capilares sanguíneos por mecanismo compensatório. De qualquer forma, independentemente da existência ou não de disfunção endotelial, o aumento da capilarização também foi associado ao aumento do desempenho físico dos animais KO SHAM no teste de tolerância ao esforço.

6.5.3. Área de secção transversa das fibras musculares

Na IC, além da transição dos tipos de fibra e da rarefação capilar presentes na musculatura esquelética, também é observado o estabelecimento do quadro de atrofia muscular, caracterizado por perda da massa muscular esquelética e diminuição da área de secção transversa das fibras musculares e do músculo como um todo. Segundo LUNDE et al. (2001), 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.

Como descrito nos resultados do presente projeto, os animais KO INF apresentaram diminuição da área de seção transversa de todas as fibras avaliadas nos músculos sóleo e plantar em relação ao seu grupo KO SHAM. Esses dados corroboram achados do nosso laboratório, onde animais com hiperatividade simpática que desenvolvem IC apresentaram atrofia muscular esquelética aos sete meses de idade, estágio mais grave da doença (BACURAU et al., 2009) e de estudos realizados em humanos que demonstraram redução da massa muscular esquelética nos pacientes com IC (MANCINI et al., 1992).

Por outro lado, embora o grupo CO INF tenha apresentado diminuição na área de secção das fibras do tipo I e IIA no músculo plantar e das fibras do tipo I e intermediárias no músculo sóleo em relação ao grupo CO SHAM, essa diferença não foi estatisticamente significativa, sugerindo que, mediante o infarto do miocárdio, os animais β_2 KO tendem a ter um agravamento ou uma antecipação do quadro de perda de massa muscular esquelética em relação aos animais controles. Isto pode estar relacionado ao fato dos receptores β_2 -adrenérgicos possuírem um efeito anabólico e anticatabólico na musculatura esquelética, ativando vias relacionadas à síntese proteica e inibindo vias relacionadas à degradação proteica (SNEDDON et al., 2001; KLINE et al., 2007; BAVIERA et al., 2010). Na ausência dos mesmos, os animais β_2 KO perderiam este efeito anabólico protetor e ficariam mais susceptíveis aos estímulos catabólicos.

Outro estudo também relacionou a importância dos receptores β_2 -adrenérgicos com a musculatura esquelética na IC, no qual pacientes de classes

funcionais II e III apresentaram aumento da massa magra e da força muscular esquelética após a administração oral de clenbuterol por doze semanas (KAMALAKKANNAN et al., 2008).

BACURAU et al. (2009) demonstraram em modelo genético de hiperatividade simpática que, aos três meses de idade (estágio onde ainda não é observada a presença de IC), os camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos apresentam hipertrofia das fibras do tipo IIA e IIB do músculo plantar. Essa hipertrofia foi atribuída à ação da hiperatividade simpática no músculo esquelético destes animais por meio dos receptores β_2 -adrenérgicos, já que a realização de um tratamento com isoproterenol promoveu hipertrofia muscular esquelética em camundongos controles, ao passo que este mesmo tratamento não induziu hipertrofia nos músculos esqueléticos dos animais β_2 KO. Por isso, é possível que, em estágios iniciais da IC, animais que expressam os receptores β_2 -adrenérgicos consigam atenuar os efeitos catabólicos presentes na síndrome por meio da hiperativação destes receptores na musculatura esquelética. Em contrapartida, com a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos esse efeito anabólico e protetor inicial da hiperatividade simpática na musculatura esquelética ficaria prejudicado, favorecendo a predominância dos estímulos catabólicos.

É importante destacar que em longo prazo a ativação do sistema nervoso simpático é prejudicial à musculatura esquelética, colaborando para a atrofia muscular na IC. Este fato pode ser observado no estudo de (BACURAU et al., 2009), onde os camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos com hiperatividade simpática apresentam atrofia de todos os tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar aos sete meses de idade (estágio mais grave da doença, com estabelecimento da IC), como mencionado acima. A hiperativação crônica do sistema nervoso simpático na IC poderia diminuir o estímulo anabólico e anti-catabólico promovido pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos por meio da redução da densidade desses receptores na superfície celular da fibra muscular esquelética. Ainda não se sabe quais são os efeitos da exposição crônica dos receptores β_2 -adrenérgicos presentes na musculatura esquelética à hiperatividade simpática na IC. Entretanto, é conhecido que o efeito promotor de crescimento atribuído aos agonistas β_2 -adrenérgicos é limitado pelo tempo de administração

destes fármacos, apresentando atenuação do efeito hipertrófico em tratamentos prolongados (KIM, LEE e ASHMORE, 1988; KIM et al., 1989; MCELLIGOTT, BARRETO e CHAUNG, 1989).

Estudos demonstram que, assim como ocorre com os receptores β -adrenérgicos no coração, os receptores β_2 -adrenérgicos são capazes de internalizar para o citoplasma da célula muscular esquelética sob estímulo de agonistas β_2 -adrenérgicos. ROTHWELL, STOCK e SUDERA (1987) demonstraram que o tratamento com clenbuterol por 18 dias reduziu 65% da densidade de receptores β_2 -adrenérgicos presentes na musculatura esquelética, o que sugere internalização seguida de *downregulation* dos receptores. JENSEN et al. (2002) também demonstraram que, após 30 minutos de estimulação por meio da administração de isoproterenol, cerca de 50% dos receptores β_2 -adrenérgicos foram internalizados na musculatura esquelética, sendo que 80% destes receptores retornaram à superfície celular subsequentemente. No entanto, não está claro no estudo se os receptores que reciclaram e retornaram à membrana estavam com a sensibilidade ao agonista preservada. Portanto, estes estudos demonstram que é possível que os receptores β_2 -adrenérgicos sofram internalização seguida de *downregulation* e/ou retornem à membrana (reciclagem) com possível dessensibilização do receptor nos músculos esqueléticos em condições de hiperatividade simpática e aumento nas concentrações das catecolaminas circulantes, como ocorre na IC.

A diminuição da área de secção transversa das fibras dos tipos IIA, intermediárias e IIB no músculo plantar e das fibras dos tipos I e IIA no músculo sóleo nos animais KO SHAM em relação aos CO SHAM também merece destaque. Este dado, juntamente com a diminuição da massa do músculo sóleo nos animais KO SHAM discutida anteriormente, mostra que animais com inativação gênica para o receptor β_2 -adrenérgico possuem atrofia muscular esquelética quando comparados aos seus animais controles. Isso pode ser explicado pela participação dos receptores β -adrenérgicos na miogênese, uma vez que estudos demonstraram superexpressão dos genes que codificam os receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos em linhagem de células C2C12 durante sua proliferação e diferenciação, sugerindo que os receptores β -adrenérgicos exercem importante papel em estágios mais

avançados da miogênese, incluindo diferenciação, fusão e maturação (TOMCZAK et al., 2004; CHEN et al., 2006; RYALL, CHURCH e LYNCH, 2010).

Outra possível explicação para a menor área de secção transversa observada nos animais KO SHAM seria a diminuição da síntese e/ou o aumento da degradação proteica. No entanto, como descrito no item 5.10 e discutido no próximo tópico, não foram observadas diferenças nas expressões de proteínas relacionadas à síntese e degradação proteica entre os grupos KO SHAM e CO SHAM.

6.6. Caracterização das vias de sinalização celular envolvidas na síntese e degradação proteica na musculatura esquelética

A análise do fenótipo muscular despertou o interesse de investigar, em maiores detalhes, as alterações musculoesqueléticas presentes no modelo de inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos com e sem indução de infarto. Diversos estudos tem demonstrado que a ativação destes receptores favorece o ganho de massa muscular (YANG e MCELLIGOTT, 1989; AGRAWAL, THAKUR e KATOCH, 2003; RYALL, SILLENCE e LYNCH, 2006; HARCOURT et al., 2007; LYNCH e RYALL, 2008). No entanto, a sinalização intracelular responsável por esta resposta ainda não é totalmente conhecida.

Muito do conhecimento sobre a sinalização β -adrenérgica na musculatura esquelética advém de trabalhos desenvolvidos em músculo cardíaco, como descrito no item 2.6 (SHAM, JONES e MORAD, 1991; XIAO et al., 1994; XIAO et al., 1999; ROCKMAN, KOCH e LEFKOWITZ, 2002). Sabe-se que além de regular o processo de contração muscular por meio da via clássica AC/AMPc/PKA, a sinalização β -adrenérgica pode interferir no controle da massa muscular principalmente por duas vias intracelulares:

- AMPc/PKA (clássica, canônica): as subunidades catalíticas da PKA fosforilam a proteína calpastatina, que é responsável por inibir a ação proteolítica das enzimas calpaínas (HAWKINS, XU e NARAYANAN, 1995; NAVEGANTES et al., 2001; REIKEN et al., 2003).

- PI3K-Akt (não-clássica): no músculo esquelético, vias de sinalização dependentes de Akt são ativadas com a estimulação β -adrenérgica (SNEDDON et al., 2001; KLINE et al., 2007). Nesse sentido, KLINE et al. (2007) demonstraram que a estimulação β_2 -adrenérgica promove a fosforilação da Akt com subsequente ativação da via da mTOR.

Em relação à via não-clássica (não canônica), a Akt, além de estimular a cascata de sinalização mediada por mTOR, minimiza a ação do sistema proteolítico dependente de ATP (sistema ubiquitina-proteassoma) por meio da fosforilação de FoxO, um fator de transcrição que, quando não fosforilado, migra para o núcleo promovendo a transcrição de genes, chamados de atrogenes, responsáveis por endereçar as proteínas para a degradação no 26S-proteassoma. Os atrogenes mais expressos na musculatura esquelética são MuRF-1 e atrogin-1/MAFbx (FURUYAMA et al., 2002; TRAN et al., 2003; SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004). Tem sido demonstrado que a ativação β_2 -adrenérgica reduz a expressão de MuRF-1 e atrogin-1 em músculos esqueléticos de animais denervados e com suspensão de pata, um efeito possivelmente mediado pela inibição de FoxO por Akt (KLINE et al., 2007).

Dessa forma, a fim de caracterizar o efeito do infarto do miocárdio e do papel dos receptores β_2 -adrenérgicos sobre as principais vias relacionadas à síntese e degradação proteica (Akt/mTOR e sistema ubiquitina-proteassoma, respectivamente) foram realizadas análises de expressão proteica e da atividade do proteassoma no músculos dos animais estudados, coletados 90 dias após os procedimentos cirúrgicos. Como mencionado anteriormente, a escolha pela avaliação de tais vias justifica-se por estas serem as principais vias relacionadas com a regulação da massa muscular esquelética (SOLOMON e GOLDBERG, 1996; SANDRI, 2008). Além disso, tem sido demonstrado que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos neste tecido é capaz de modular as vias Akt/mTOR e ubiquitina-proteassoma (LOPEZ-ILASACA et al., 1997; MURGA et al., 1998; MURGA, FUKUHARA e GUTKIND, 2000; GONCALVES et al., 2009).

Essas análises foram realizadas no músculo plantar pois é conhecido que os músculos glicolíticos sofrem mais com os estímulos catabólicos presentes em doenças inflamatórias e crônico-degenerativas, como a IC (ACHARYYA et al., 2004;

LI et al., 2007). Além disso, apesar de a densidade de receptores β_2 -adrenérgicos ser maior em músculos oxidativos do que em músculos glicolíticos, a magnitude de resposta da regulação da massa muscular esquelética pelo receptor β_2 -adrenérgico parece ser maior nos músculos glicolíticos (SATO et al., 2011).

No presente estudo, ao contrário do esperado, não foram observadas diferenças nas expressões das proteínas relacionadas às vias de síntese e degradação proteica entre os animais KO SHAM e CO SHAM, sugerindo que estas vias não colaboraram para a diminuição da área de secção transversa das fibras musculares apresentada pelos animais KO SHAM. Estes dados podem ser melhor compreendidos levando-se em consideração que os camundongos encontram-se na fase adulta e com o trofismo muscular estável e bem estabelecido, sem a presença de doenças ou influências externas que poderiam fazer com que houvesse um desbalanço entre as vias de síntese e degradação proteicas. Como discutido no item 6.5.3, a diminuição da área de secção transversa das fibras musculares presente nos animais KO SHAM pode ser resultante de um prejuízo durante o processo de miogênese (TOMCZAK et al., 2004; CHEN et al., 2006; RYALL, CHURCH e LYNCH, 2010).

Embora não tenham sido observadas diferenças entre os animais CO e KO sham nas expressões das proteínas relacionadas às vias de síntese e degradação proteicas, o grupo KO SHAM apresentou menor atividade do 26S-proteassoma quando comparado ao grupo CO SHAM. Foi demonstrado em músculo cardíaco que o 26S-proteassoma pode ser diretamente ativado pela PKA, alvo dos receptores β_2 -adrenérgicos (ZONG et al., 2006; ASAI et al., 2009). É possível que o mesmo ocorra na musculatura esquelética, sendo que na ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos, como ocorre nos animais β_2 KO, a ativação do proteassoma por esta via ficaria prejudicada. Contudo, ainda não existem estudos na literatura demonstrando que esta relação entre receptores β_2 -adrenérgicos e atividade do proteassoma também acontece no músculo esquelético.

As consequências de uma menor ativação do proteassoma para a musculatura esquelética dos animais β_2 KO seriam principalmente um desbalanço na regulação da massa muscular a favor da síntese, aumentando assim a área de

secção transversa dos músculos esqueléticos, e/ou um prejuízo no controle de qualidade de proteína, conhecido como um processo de monitorar e proteger a célula do acúmulo de proteínas mal-formadas ou danificadas (LEE e TSAI, 2005), que poderia interferir negativamente na função muscular. Entretanto, como observado anteriormente, os animais KO SHAM não apresentam hipertrofia dos músculos esqueléticos avaliados e também não apresentam prejuízos na função muscular esquelética avaliada pelos testes de deambulação e Rota Rod. Por isso, outros estudos precisam ser realizados a fim de melhor elucidar a relação direta entre os receptores β_2 -adrenérgicos e o proteassoma na musculatura esquelética e as consequências disto para este tecido.

Conforme demonstrado nos resultados, o infarto do miocárdio não alterou a expressão de proteínas relacionadas à síntese proteica nos animais CO e β_2 KO. No entanto, houve uma tendência de diminuição da expressão de p-Akt (ser 473) e p-4E-BP1 (thr37/46) nos animais KO INF. Quanto à degradação proteica, o infarto do miocárdio aumentou a expressão proteica de atrogin-1 nos animais CO INF e KO INF. Além disso, os animais KO INF também apresentaram uma tendência à diminuição da fosforilação de FoxO3a e apresentaram aumento significativo da expressão de proteínas poliubiquitinadas e da atividade do 26S-proteassoma, o que não foi observado nos animais CO INF. Esses resultados obtidos em relação às vias de sinalização sugerem uma maior participação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma na atrofia muscular esquelética observada nos animais β_2 KO infartados em detrimento da síntese proteica.

Embora a diminuição da síntese proteica na IC não seja um dado consistente na literatura, estudos tem demonstrado a contribuição da via IGF-1/PI3K/Akt na atrofia muscular esquelética observada nessa síndrome (SCHULZE et al., 2002). TOTH et al. (2011) demonstraram uma diminuição da fosforilação de Akt no resíduo da serina 473 no músculo vasto lateral de pacientes com IC, porém não observaram diferenças na expressão de IGF1, Akt1 total, mTOR, p-mTOR, GSK3 β , p70S6K e p-4E-BP1. Por outro lado, NIEBAUER et al. (1998) observaram uma associação entre a perda de massa muscular esquelética e baixas concentrações de IGF-1 circulantes em pacientes com IC, enquanto que HAMBRECHT et al. (2002) demonstraram

diminuição da expressão de IGF-1 em amostras de biópsia do músculo vasto lateral de pacientes com IC, sem alterações nos níveis séricos de IGF-1.

Em relação à degradação proteica, a participação do sistema ubiquitina-proteassoma na atrofia muscular observada no presente estudo corrobora dados do nosso laboratório que também demonstram, em animais e pacientes com IC, aumento da expressão gênica de atrogin-1 e da atividade do proteassoma (CUNHA et al, submetido). Além dos trabalhos do nosso laboratório, outros estudos tem demonstrado a relação entre a ativação do sistema ubiquitina-proteassoma com a atrofia muscular esquelética em diferentes modelos experimentais de IC (LI et al., 2007; VAN HEES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; PALUS et al., 2011).

Portanto, é possível observar que o infarto do miocárdio promoveu maior ativação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma nos animais β_2 KO, o qual está fortemente associado à atrofia muscular encontrada nestes animais. Além disso, a tendência na diminuição da via de síntese proteica Akt/mTOR também pode ter contribuído para a atrofia muscular observada nos animais KO INF, uma vez que a diminuição da fosforilação de Akt e consequentemente de 4E-BP1 favorece a inibição da síntese proteica (SANDRI, 2008).

Considerando que os animais KO INF apresentaram atrofia muscular associada ao aumento de atrogin-1, aumento na ubiquitinação de proteínas e na atividade do proteassoma e tendência à diminuição da fosforilação de Akt, 4E-BP1 e FoxO3a, e que os animais CO INF não apresentaram tais respostas, com exceção do aumento de atrogin-1, sugere-se que a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos antecipa o quadro de atrofia muscular esquelética desencadeada pela IC em camundongos por meio da modulação das vias de síntese e degradação proteicas.

Outros estudos também verificaram a participação dos receptores β_2 -adrenérgicos na ativação das vias de sinalização celulares envolvidas na regulação da massa muscular esquelética em modelos de atrofia muscular. KLINE et al. (2007) observaram, em modelos de suspensão de pata e denervação, aumento das expressões gênicas de MuRF-1 e atrogin-1 associadas à presença de atrofia muscular esquelética, e a administração de clenbuterol foi capaz de inibir o aumento desses atrogenes na musculatura esquelética dos animais tratados. Quando

administrado em conjunto com rapamicina (inibidor de mTOR), o tratamento com clenbuterol continuou sendo efetivo em prevenir a atrofia e o aumento de MuRF-1 e atrogin-1, demonstrando que a ação anti-catabólica da ativação β_2 -adrenérgica sobre a musculatura esquelética não foi mediada por mTOR.

GONCALVES et al. (2012) também demonstraram que o tratamento com clenbuterol inibiu o aumento das expressões de MuRF-1 e atrogin-1 no músculo sóleo de animais denervados. No entanto, a denervação e o tratamento com clenbuterol não alteraram a expressão de IGF-1 e a fosforilação de Akt, sugerindo que a via IGF1/PI3K/Akt não está envolvida na atrofia muscular esquelética no modelo de denervação.

Em um modelo de caquexia do câncer, o tratamento com formoterol (agonista β_2 -adrenérgico seletivo) aumentou a taxa de síntese e diminuiu a taxa de degradação proteica, as quais foram associadas à diminuição da expressão gênica de ubiquitina e subunidades do proteassoma, bem como à diminuição da atividade do proteassoma em ratos (BUSQUETS et al., 2004).

Estes estudos ressaltam a importância da ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos em estados catabólicos e demonstram a relação existente entre esses receptores e as vias de síntese e degradação proteicas, sendo que a associação dos receptores β_2 -adrenérgicos com a via proteolítica ubiquitina-proteassoma parece ser mais consistente.

Portanto, por possuir esses efeitos anabólicos e anti-catabólicos, o aumento da concentração de catecolaminas desencadeado pelo infarto do miocárdio no presente estudo poderia atenuar a ativação dos sistemas proteolíticos por meio da ação β_2 -adrenérgica, prevenindo a perda de massa muscular esquelética nos animais CO INF. Por outro lado, por não expressarem os receptores β_2 -adrenérgicos, os animais KO INF ficariam mais susceptíveis aos efeitos deletérios da hiperatividade simpática, como aumento de estresse oxidativo e inflamação, por exemplo, que culminariam na antecipação da atrofia muscular esquelética.

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo que demonstra a relação entre os receptores β_2 -adrenérgicos e as vias de síntese e degradação proteicas envolvidas com a atrofia muscular esquelética na IC.

FIGURA 18: Esquema das possíveis proteínas envolvidas na atrofia muscular desencadeada pela insuficiência cardíaca na ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a ausência dos receptores β_2 -adrenérgicos agravam e/ou antecipam as alterações musculoesqueléticas observadas na insuficiência cardíaca, principalmente a atrofia muscular, e que a ativação do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma e a inibição da síntese proteica por meio da via Akt/4E-BP1 parecem colaborar para estas respostas. Desta forma, conclui-se que os receptores β_2 -adrenérgicos possuem importante papel na manutenção da massa muscular esquelética na insuficiência cardíaca por serem capazes de modular vias catabólicas e anabólicas. Portanto, uma compreensão aprofundada sobre a relação causa-efeito entre estes receptores e as alterações musculoesqueléticas na insuficiência cardíaca será de extrema importância para o futuro desenvolvimento de fármacos e terapias que visem aprimorar o tratamento da miopatia esquelética nesta síndrome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYYA, S., LADNER, K. J., NELSEN, L. L., DAMRAUER, J., REISER, P. J., SWOAP, S. e GUTTRIDGE, D. C. **Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products.** J Clin Invest 114(3): 370-378. 2004
- AGRAWAL, S., THAKUR, P. e KATOCH, S. S. **Beta adrenoceptor agonists, clenbuterol, and isoproterenol retard denervation atrophy in rat gastrocnemius muscle: use of 3-methylhistidine as a marker of myofibrillar degeneration.** Jpn J Physiol 53(3): 229-237. 2003
- AHLQUIST, R. P. **A study of the adrenotropic receptors.** Am J Physiol 153(3): 586-600. 1948
- ANDRADE, F. N. D. e LAMEU, E. B. **Caquexia cardíaca.** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro 18(3): 220-226. 2005
- ANKER, S. D., SWAN, J. W., VOLTERRANI, M., CHUA, T. P., CLARK, A. L., POOLE-WILSON, P. A. e 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.** Eur Heart J 18(2): 259-269. 1997
- ANTUNES-CORREA, L. M., KANAMURA, B. Y., MELO, R. C., NOBRE, T. S., UENO, L. M., FRANCO, F. G., ROVEDA, F., BRAGA, A. M., RONDON, M. U., BRUM, P. C., BARRETTO, A. C., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training improves neurovascular control and functional capacity in heart failure patients regardless of age.** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2011
- ARAUJO, D. V., TAVARES, L. R., VERÍSSIMO, R., FERRAZ, M. B. e MESQUITA, E. T. **Custo da Insuficiência Cardíaca no Sistema Único de Saúde.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia 84(5): 422-427. 2005
- ASAI, M., TSUKAMOTO, O., MINAMINO, T., ASANUMA, H., FUJITA, M., ASANO, Y., TAKAHAMA, H., SASAKI, H., HIGO, S., ASAKURA, M., TAKASHIMA, S., HORI, M. e KITAKAZE, M. **PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in vivo canine hearts.** J Mol Cell Cardiol 46(4): 452-462. 2009
- ASENSIO, C., JIMENEZ, M., KUHNE, F., ROHNER-JEANRENAUD, F. e MUZZIN, P. **The lack of beta-adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance.** Diabetes 54(12): 3490-3495. 2005

- BACHMANN, J., HEILIGENSETZER, M., KRAKOWSKI-ROOSEN, H., BUCHLER, M. W., FRIESS, H. e MARTIGNONI, M. E. **Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer.** J Gastrointest Surg 12(7): 1193-1201. 2008
- BACURAU, A. V., JARDIM, M. A., FERREIRA, J. C., BECHARA, L. R., BUENO, C. R., JR., ALBA-LOUREIRO, T. C., NEGRAO, C. E., CASARINI, D. E., CURI, R., RAMIRES, P. R., MORISCOT, A. S. e BRUM, P. C. **Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training.** J Appl Physiol 106(5): 1631-1640. 2009
- BARRETTO, A. C. P., NETO, C. D., MADY, C., ALBUQUERQUE, D. C. D., FILHO, D. F. B., BRAILE, D. M., BOCCHI, E. A., MESQUITA, E. T., VILAS-BOAS, F., FILHO, F. M. A., FEITOSA, G. S., DOHMANN, H. F. R., JÚNIOR, H. V., ATIÉ, J., NETO, J. A. M., MATEOS, J. C. P., BODANESE, L. C., MONTERA, M. W., MOREIRA, M. D. C. V., BATLOUNI, M., CLAUSELL, N. O., BROFMAN, P. R. S., ROCHA, R. M., RASSI, S. e JÚNIOR, W. M. **Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 79(4): 1-30. 2002
- BAVIERA, A. M., ZANON, N. M., NAVEGANTES, L. C. e KETTELHUT, I. C. **Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle.** Mol Cell Endocrinol 315(1-2): 104-112. 2010
- BEITZEL, F., GREGOREVIC, P., RYALL, J. G., PLANT, D. R., SILENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury.** J Appl Physiol 96(4): 1385-1392. 2004
- BERNSTEIN, D. **Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking beta1- and beta2-adrenergic receptors.** Trends Cardiovasc Med 12(7): 287-294. 2002
- BERNSTEIN, D. **Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease.** Physiol Genomics 13(3): 217-226. 2003
- BOCCHI, E. A., BRAGA, F. G. M., FERREIRA, S. M. A., ROHDE, L. E. P., OLIVEIRA, W. A. D., ALMEIDA, D. R. D., MOREIRA, M. D. C. V., BESTETTI, R. B., BORDIGNON, S., AZEVEDO, C., TINOCO, E. M., ROCHA, R. M., ISSA, V. S., FERRAZ, A., CRUZ, F. D. D., GUIMARÃES, G. V., MONTERA, V. D. S. P., ALBUQUERQUE, D. C., BACAL, F., SOUZA, G. E. C., NETO, J. M. R., CLAUSELL, N. O., MARTINS, S. M., SICILIANO, A., NETO, J. D. D. S., MOREIRA, L. F., TEIXEIRA, R. A., MOURA, L. Z., BECK-DA-SILVA, L., RASSI, S., AZEKA, E., HOROWITZ, E., RAMIRES, F., SIMÕES, M. V., CASTRO, R. B. P. D., SALEMI, V. M. C., JUNIOR, H. V., VILA, J. H., SIMÕES, R., ALBANESI, F. e MONTERA, M. W. **III Diretriz Brasileira de**

- Insuficiência Cardíaca Crônica.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia 93(1): 1-71. 2009
- BOCKAERT, J. e PIN, J. P. **Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.** EMBO J 18(7): 1723-1729. 1999
- BODINE, S. C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V. K., NUNEZ, L., CLARKE, B. A., POUHEYMIROU, W. T., PANARO, F. J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z. Q., VALENZUELA, D. M., DECHIARA, T. M., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. e GLASS, D. J. **Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy.** Science 294(5547): 1704-1708. 2001
- BODINE, S. C., STITT, T. N., GONZALEZ, M., KLINE, W. O., STOVER, G. L., BAUERLEIN, R., ZLOTCHENKO, E., SCRIMGEOUR, A., LAWRENCE, J. C., GLASS, D. J. e YANCOPOULOS, G. D. **Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo.** Nat Cell Biol 3(11): 1014-1019. 2001
- BOWERS, R. R., GETTYS, T. W., PRPIC, V., HARRIS, R. B. e 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 288(5): R1354-1360. 2005
- BRICOUT, V. A., SERRURIER, B. D. e BIGARD, A. X. **Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles.** Acta Physiol Scand 180(3): 271-280. 2004
- BRODDE, O. E. **Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure.** Pharmacol Rev 43(2): 203-242. 1991
- BROOKE, M. H. e KAISER, K. K. **Muscle fiber types: how many and what kind?** Arch Neurol 23(4): 369-379. 1970
- BRUM, P. C., BACURAU, A. V., MEDEIROS, A., FERREIRA, J. C., VANZELLI, A. S. e NEGRAO, C. E. **Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function.** Braz J Med Biol Res 44(9): 827-835. 2011
- BRUM, P. C., ROLIM, N. P., BACURAU, A. V. e MEDEIROS, A. **Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors.** An Acad Bras Cienc 78(3): 485-503. 2006
- BUENO, C. R., JR., FERREIRA, J. C., PEREIRA, M. G., BACURAU, A. V. e BRUM, P. C. **Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺**

- handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure.** J Appl Physiol 109(3): 702-709. 2010
- BURNISTON, J. G., MCLEAN, L., BEYNON, R. J. e GOLDSPINK, D. F. **Anabolic effects of a non-myotoxic dose of the beta2-adrenergic receptor agonist clenbuterol on rat plantaris muscle.** Muscle Nerve 35(2): 217-223. 2007
- BUSQUETS, S., FIGUERAS, M. T., FUSTER, G., ALMENDRO, V., MOORE-CARRASCO, R., AMETLLER, E., ARGILES, J. M. e LOPEZ-SORIANO, F. J. **Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting.** Cancer Res 64(18): 6725-6731. 2004
- CARVALHO, R. F., CASTAN, E. P., COELHO, C. A., LOPES, F. S., ALMEIDA, F. L., MICHELIN, A., DE SOUZA, R. W., ARAUJO, J. P., JR., CICOONA, A. C. e DAL PAI-SILVA, M. **Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy.** J Mol Histol 41(1): 81-87. 2010
- CHABOT, A., JIANG, B. H., SHI, Y., TARDIF, J. C. e DUPUIS, J. **Role of aldosterone on lung structural remodelling and right ventricular function in congestive heart failure.** BMC Cardiovasc Disord 11(1): 72. 2011
- CHATTERJEE, K. **Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin.** Am J Cardiol 95(9A): 8B-13B. 2005
- CHAVES, A. A., WEINSTEIN, D. M. e BAUER, J. A. **Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen.** Life Sci 69(2): 213-222. 2001
- CHEN, I. H., HUBER, M., GUAN, T., BUBECK, A. e GERACE, L. **Nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) that are up-regulated during myogenesis.** BMC Cell Biol 7: 38. 2006
- CHOO, J. J., HORAN, M. A., LITTLE, R. A. e ROTHWELL, N. J. **Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta 2-adrenoceptor activation.** Am J Physiol 263(1 Pt 1): E50-56. 1992
- CHRUSCINSKI, A. J., ROHRER, D. K., SCHAUBLE, E., DESAI, K. H., BERNSTEIN, D. e KOBILKA, B. K. **Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene.** J Biol Chem 274(24): 16694-16700. 1999
- CICCARELLI, M., CIPOLLETTA, E., SANTULLI, G., CAMPANILE, A., PUMIGLIA, K., CERVERO, P., PASTORE, L., ASTONE, D., TRIMARCO, B. e IACCARINO, G. **Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC.** Cell Signal 19(9): 1949-1955. 2007
- CLARK, A. L., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Exercise limitation in chronic heart failure: central role of the periphery.** J Am Coll Cardiol 28(5): 1092-1102. 1996

- COIRAULT, C., GUELICH, A., BARBRY, T., SAMUEL, J. L., RIOU, B. e LECARPENTIER, Y. **Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(2): H1009-1017. 2007
- CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W. F. e GUTKIND, J. S. **Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits.** Nature 369(6479): 418-420. 1994
- CRIMI, E., IGNARRO, L. J., CACCIATORE, F. e NAPOLI, C. **Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure.** Nat Rev Cardiol 6(4): 292-300. 2009
- DASCAL, N. **Ion-channel regulation by G proteins.** Trends Endocrinol Metab 12(9): 391-398. 2001
- DEEGAN, R., HE, H. B., KRIVORUK, Y., WOOD, A. J. e WOOD, M. **Regulation of norepinephrine release by beta 2-adrenergic receptors during halothane anesthesia.** Anesthesiology 82(6): 1417-1425. 1995
- DIVERSE-PIERLUISSI, M., MCINTIRE, W. E., MYUNG, C. S., LINDORFER, M. A., GARRISON, J. C., GOY, M. F. e DUNLAP, K. **Selective coupling of G protein beta gamma complexes to inhibition of Ca²⁺ channels.** J Biol Chem 275(37): 28380-28385. 2000
- DREXLER, H., RIEDE, U., MUNZEL, T., KONIG, H., FUNKE, E. e JUST, H. **Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure.** Circulation 85(5): 1751-1759. 1992
- ELFELLAH, M. S., DALLING, R., KANTOLA, I. M. e REID, J. L. **Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age.** Br J Clin Pharmacol 27(1): 31-38. 1989
- ESLER, M., JENNINGS, G., BIVIANO, B., LAMBERT, G. e HASKING, G. **Mechanism of elevated plasma noradrenaline in the course of essential hypertension.** J Cardiovasc Pharmacol 8 Suppl 5: S39-43. 1986
- ESLER, M. D., LAMBERT, G. W., FERRIER, C., KAYE, D. M., WALLIN, B. G., KALFF, V., KELLY, M. J. e JENNINGS, G. L. **Central nervous system noradrenergic control of sympathetic outflow in normotensive and hypertensive humans.** Clin Exp Hypertens 17(1-2): 409-423. 1995
- FERREIRA, J. C., ROLIM, N. P., BARTHOLOMEU, J. B., GOBATTO, C. A., KOKUBUN, E. e BRUM, P. C. **Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training.** Clin Exp Pharmacol Physiol 34(8): 760-765. 2007

- FERRO, A., COASH, M., YAMAMOTO, T., ROB, J., JI, Y. e QUEEN, L. **Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt.** *Br J Pharmacol* 143(3): 397-403. 2004
- FIGUEROA, M. S. e PETERS, J. I. **Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care.** *Respir Care* 51(4): 403-412. 2006
- FINSEN, A. V., CHRISTENSEN, G. e SJAASTAD, I. **Echocardiographic parameters discriminating myocardial infarction with pulmonary congestion from myocardial infarction without congestion in the mouse.** *J Appl Physiol* 98(2): 680-689. 2005
- FORD, C. E., SKIBA, N. P., BAE, H., DAAKA, Y., REUVENY, E., SHEKTER, L. R., ROSAL, R., WENG, G., YANG, C. S., IYENGAR, R., MILLER, R. J., JAN, L. Y., LEFKOWITZ, R. J. e HAMM, H. E. **Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors.** *Science* 280(5367): 1271-1274. 1998
- FOX, K. A., STEG, P. G., EAGLE, K. A., GOODMAN, S. G., ANDERSON, F. A., JR., GRANGER, C. B., FLATHER, M. D., BUDAJ, A., QUILL, A. e GORE, J. M. **Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006.** *JAMA* 297(17): 1892-1900. 2007
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. e SCHIOTH, H. B. **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-1272. 2003
- FRIGERIO, M. e ROUBINA, E. **Drugs for left ventricular remodeling in heart failure.** *Am J Cardiol* 96(12A): 10L-18L. 2005
- FURUYAMA, T., YAMASHITA, H., KITAYAMA, K., HIGAMI, Y., SHIMOKAWA, I. e MORI, N. **Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the rat skeletal muscles.** *Microsc Res Tech* 59(4): 331-334. 2002
- GAO, X. M., XU, Q., KIRIAZIS, H., DART, A. M. e DU, X. J. **Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology.** *Cardiovasc Res* 65(2): 469-477. 2005
- GIELEN, S., ADAMS, V., MOBIUS-WINKLER, S., LINKE, A., ERBS, S., YU, J., KEMPF, W., SCHUBERT, A., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 42(5): 861-868. 2003

- GLICKMAN, M. H. e CIECHANOVER, A. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.** *Physiol Rev* 82(2): 373-428. 2002
- GOMES, M. D., LECKER, S. H., JAGOE, R. T., NAVON, A. e GOLDBERG, A. L. **Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-14445. 2001
- GONCALVES, D. A., LIRA, E. C., BAVIERA, A. M., CAO, P., ZANON, N. M., ARANY, Z., BEDARD, N., TANKSALE, P., WING, S. S., LECKER, S. H., KETTELHUT, I. C. e NAVEGANTES, L. C. **Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle.** *Endocrinology* 150(12): 5395-5404. 2009
- GONCALVES, D. A., SILVEIRA, W. A., LIRA, E. C., GRACA, F. A., PAULA-GOMES, S., ZANON, N. M., KETTELHUT, I. C. e NAVEGANTES, L. C. **Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(1): E123-133. 2012
- GORDON, A. e VOIPIO-PULKKI, L. M. **Crosstalk of the heart and periphery: skeletal and cardiac muscle as therapeutic targets in heart failure.** *Ann Med* 29(4): 327-331. 1997
- GROSS, S. R., MAYER, S. E. e LONGSHORE, M. A. **Stimulation of glycogenolysis by beta adrenergic agonists in skeletal muscle of mice with the phosphorylase kinase deficiency mutation (I strain).** *J Pharmacol Exp Ther* 198(3): 526-538. 1976
- H BALMAIN, J., BIGGERS, J. e CLARINGBOLD, P. **Micromethod for the Estimation of Glycogen in the Genital Organs of the Mouse.** *Australian Journal of Biological Sciences* 9(1): 139-146. 1956
- HAMALAINEN, N. e 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* 41(5): 733-743. 1993
- HAMBRECHT, R., FIEHN, E., YU, J., NIEBAUER, J., WEIGL, C., HILBRICH, L., ADAMS, V., RIEDE, U. e SCHULER, G. **Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 29(5): 1067-1073. 1997
- 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. e SCHULER, G. **Reduction of insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of noncachectic patients with chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 39(7): 1175-1181. 2002

- HARCOURT, L. J., SCHERTZER, J. D., RYALL, J. G. e LYNCH, G. S. **Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue.** Neuromuscul Disord 17(1): 47-55. 2007
- HARRINGTON, D., ANKER, S. D., CHUA, T. P., WEBB-PEPLOE, K. M., PONIKOWSKI, P. P., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure.** J Am Coll Cardiol 30(7): 1758-1764. 1997
- HARRINGTON, D., ANKER, S. D., CHUA, T. P., WEBB-PEPLOE, K. M., PONIKOWSKI, P. P., POOLE-WILSON, P. A. e COATS, A. J. **Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure.** Journal of the American College of Cardiology 30(7): 1758-1764. 1997
- HASSELGREN, P. O., WRAY, C. e MAMMEN, J. **Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome.** Biochem Biophys Res Commun 290(1): 1-10. 2002
- HAWKINS, C., XU, A. e NARAYANAN, N. **Comparison of the effects of the membrane-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase on Ca(2+)-ATPase function in cardiac and slow-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.** Mol Cell Biochem 142(2): 131-138. 1995
- HEART FAILURE SOCIETY OF, A. **Conceptualization and working definition of heart failure.** J Card Fail 12(1): e10-11. 2006
- HINKLE, R. T., HODGE, K. M., CODY, D. B., SHELDON, R. J., KOBILKA, B. K. e ISFORT, R. J. **Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor.** Muscle Nerve 25(5): 729-734. 2002
- HOOD, W. B., JR. **Experimental myocardial infarction. 3. Recovery of left ventricular function in the healing phase. Contribution of increased fiber shortening in noninfarcted myocardium.** Am Heart J 79(4): 531-538. 1970
- ISSEKUTZ, B., JR. **Effect of beta-adrenergic blockade on lactate turnover in exercising dogs.** J Appl Physiol 57(6): 1754-1759. 1984
- JACKMAN, R. W. e KANDARIAN, S. C. **The molecular basis of skeletal muscle atrophy.** Am J Physiol Cell Physiol 287(4): C834-843. 2004
- JANSSEN, P. (2001). The Deflection Point. In: Lactate Threshold Training. Champain: pp 300.
- JANSSEN, T. W., DALLMEIJER, A. J. e VAN DER WOUDE, L. H. **Physical capacity and race performance of handcycle users.** J Rehabil Res Dev 38(1): 33-40. 2001

- JASMIN, J. F., CALDERONE, A., LEUNG, T. K., VILLENEUVE, L. e DUPUIS, J. **Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan.** Cardiovasc Res 58(3): 621-631. 2003
- JASMIN, J. F., MERCIER, I., HNASKO, R., CHEUNG, M. W., TANOWITZ, H. B., DUPUIS, J. e LISANTI, M. P. **Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression.** Cardiovasc Res 63(4): 747-755. 2004
- JENSEN, J., BRENNESVIK, E. O., BERGERSEN, H., OSELAND, H., JEBENS, E. e BRORS, O. **Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles.** Pflugers Arch 444(1-2): 213-219. 2002
- JENSEN, J., BRORS, O. e DAHL, H. A. **Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types.** Pharmacol Toxicol 76(6): 380-385. 1995
- JOHNS, T. N. e OLSON, B. J. **Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals.** Ann Surg 140(5): 675-682. 1954
- JOHNSON, M. **The beta-adrenoceptor.** Am J Respir Crit Care Med 158(5 Pt 3): S146-153. 1998
- JONDEAU, G., KATZ, S. D., ZOHMAN, L., GOLDBERGER, M., MCCARTHY, M., BOURDARIAS, J. P. e 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 86(5): 1351-1356. 1992
- JONES, S. W., BAKER, D. J., GARDINER, S. M., BENNETT, T., TIMMONS, J. A. e GREENHAFF, P. L. **The effect of the beta2-adrenoceptor agonist prodrug BRL-47672 on cardiovascular function, skeletal muscle myosin heavy chain, and MyoD expression in the rat.** J Pharmacol Exp Ther 311(3): 1225-1231. 2004
- JONES, S. W., BAKER, D. J. e GREENHAFF, P. L. **G protein-coupled receptor kinases 2 and 5 are differentially expressed in rat skeletal muscle and remain unchanged following beta2-agonist administration.** Exp Physiol 88(2): 277-284. 2003
- KAMALAKKANNAN, G., PETRILLI, C. M., GEORGE, I., LAMANCA, J., MCLAUGHLIN, B. T., SHANE, E., MANCINI, D. M. e MAYBAUM, S. **Clenbuterol increases lean muscle mass but not endurance in patients with chronic heart failure.** J Heart Lung Transplant 27(4): 457-461. 2008
- KAPANCI, Y., BURGAN, S., PIETRA, G. G., CONNE, B. e GABBIANI, G. **Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension.** Am J Pathol 136(4): 881-889. 1990

- KARDYS, I., DECKERS, J. W., STRICKER, B. H., VLETTER, W. B., HOFMAN, A. e WITTEMAN, J. **Distribution of echocardiographic parameters and their associations with cardiovascular risk factors in the Rotterdam Study.** Eur J Epidemiol 25(7): 481-490. 2010
- KENNEL, P. F., FONTENEAU, P., MARTIN, E., SCHMIDT, J. M., AZZOUZ, M., BORG, J., GUENET, J. L., SCHMALBRUCH, H., WARTER, J. M. e POINDRON, P. **Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease.** Neurobiol Dis 3(2): 137-147. 1996
- KIM, Y. S., LEE, Y. B. e ASHMORE, C. R. **Cimaterol-induced growth in rats: growth pattern and biochemical characteristics.** Growth Dev Aging 52(1): 41-45. 1988
- KIM, Y. S., LEE, Y. B., GARRETT, W. N. e DALRYMPLE, R. H. **Effects of cimaterol on nitrogen retention and energy utilization in lambs.** J Anim Sci 67(3): 674-681. 1989
- KIM, Y. S., SAINZ, R. D., MOLENAAR, P. e SUMMERS, R. J. **Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles.** Biochem Pharmacol 42(9): 1783-1789. 1991
- KIM, Y. S., SAINZ, R. D., SUMMERS, R. J. e MOLENAAR, P. **Cimaterol reduces beta-adrenergic receptor density in rat skeletal muscles.** J Anim Sci 70(1): 115-122. 1992
- KLINE, W. O., PANARO, F. J., YANG, H. e BODINE, S. C. **Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol.** J Appl Physiol 102(2): 740-747. 2007
- KUHN, B., CRISTEL, C., WIELAND, T., SCHULTZ, G. e GUDERMANN, T. **G-protein betagamma-subunits contribute to the coupling specificity of the beta2-adrenergic receptor to G(s).** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 365(3): 231-241. 2002
- KUMAR, R., HOOD, W. B., JR., JOISON, J., NORMAN, J. C. e ABELMANN, W. H. **Experimental myocardial infarction. II. Acute depression and subsequent recovery of left ventricular function: serial measurements in intact conscious dogs.** J Clin Invest 49(1): 55-62. 1970
- LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E. e GOLDBERG, A. L. **Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states.** J Nutr 129(1S Suppl): 227S-237S. 1999
- LEE, S. e TSAI, F. T. **Molecular chaperones in protein quality control.** J Biochem Mol Biol 38(3): 259-265. 2005

- LEES, J. **Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre.** Eur J Cancer Care (Engl) 8(3): 133-136. 1999
- LENK, K., SCHULER, G. e ADAMS, V. **Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training.** J Cachexia Sarcopenia Muscle 1(1): 9-21. 2010
- LI, P., WATERS, R. E., REDFERN, S. I., ZHANG, M., MAO, L., ANNEX, B. H. e YAN, Z. **Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice.** Am J Pathol 170(2): 599-608. 2007
- LINDENFELD, J., ALBERT, N. M., BOEHMER, J. P., COLLINS, S. P., EZEKOWITZ, J. A., GIVERTZ, M. M., KATZ, S. D., KLAPHOLZ, M., MOSER, D. K., ROGERS, J. G., STARLING, R. C., STEVENSON, W. G., TANG, W. H., TEERLINK, J. R. e WALSH, M. N. **HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline.** J Card Fail 16(6): e1-194. 2010
- LINKE, A., ADAMS, V., SCHULZE, P. C., ERBS, S., GIELEN, S., FIEHN, E., MOBIUS-WINKLER, S., SCHUBERT, A., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle.** Circulation 111(14): 1763-1770. 2005
- LIPKIN, D. P., JONES, D. A., ROUND, J. M. e POOLE-WILSON, P. A. **Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure.** Int J Cardiol 18(2): 187-195. 1988
- LITWIN, S. E., KATZ, S. E., MORGAN, J. P. e DOUGLAS, P. S. **Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat.** Circulation 89(1): 345-354. 1994
- LIU, Y. L. e STOCK, M. J. **Acute effects of the beta 3-adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilisation.** Br J Pharmacol 114(4): 888-894. 1995
- LOHSE, M. J. **G-Proteins and their regulators.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 360(1): 3-4. 1999
- LOPEZ-ILASACA, M., CRESPO, P., PELLICI, P. G., GUTKIND, J. S. e WETZKER, R. **Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma.** Science 275(5298): 394-397. 1997
- LU, H., ZONG, C., WANG, Y., YOUNG, G. W., DENG, N., SOUDA, P., LI, X., WHITELEGGE, J., DREWS, O., YANG, P. Y. e PING, P. **Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach.** Mol Cell Proteomics 7(11): 2073-2089. 2008

- LUNDE, P. K., SJAASTAD, I., SCHIOTZ THORUD, H. M. e SEJERSTED, O. M. **Skeletal muscle disorders in heart failure.** Acta Physiol Scand 171(3): 277-294. 2001
- LUNDE, P. K., SJAASTAD, I., SCHIOTZ THORUD, H. M. e SEJERSTED, O. M. **Skeletal muscle disorders in heart failure.** Acta Physiologica Scandinavica 171(3): 277-294. 2001
- LYMPEROPOULOS, A., RENGO, G., GAO, E., EBERT, S. N., DORN, G. W., 2ND e KOCH, W. J. **Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction.** J Biol Chem 285(21): 16378-16386. 2010
- LYNCH, G. S. e RYALL, J. G. **Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease.** Physiol Rev 88(2): 729-767. 2008
- LYNCH, G. S., SCHERTZER, J. D. e RYALL, J. G. **Therapeutic approaches for muscle wasting disorders.** Pharmacol Ther 113(3): 461-487. 2007
- MANCINI, D. M., COYLE, E., COGGAN, A., BELTZ, J., FERRARO, N., MONTAIN, S. e WILSON, J. R. **Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure.** Circulation 80(5): 1338-1346. 1989
- MANCINI, D. M., WALTER, G., REICHEK, N., LENKINSKI, R., MCCULLY, K. K., MULLEN, J. L. e WILSON, J. R. **Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure.** Circulation 85(4): 1364-1373. 1992
- MARANTZ, P. R., TOBIN, J. N., WASSERTHEIL-SMOLLER, S., STEINGART, R. M., WEXLER, J. P., BUDNER, N., LENSE, L. e WACHSPRESS, J. **The relationship between left ventricular systolic function and congestive heart failure diagnosed by clinical criteria.** Circulation 77(3): 607-612. 1988
- MARTIN, W. H., 3RD, MURPHREE, S. S. e SAFFITZ, J. E. **Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle.** Circ Res 64(6): 1096-1105. 1989
- MARTINEZ, P. F., OKOSHI, K., ZORNOFF, L. A., OLIVEIRA, S. A., JR., CAMPOS, D. H., LIMA, A. R., DAMATTO, R. L., CEZAR, M. D., BONOMO, C., GUIZONI, D. M., PADOVANI, C. R., CICOGNA, A. C. e OKOSHI, M. P. **Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats.** J Appl Physiol 111(2): 543-551. 2011
- MATSUSHIMA, S., IDE, T., YAMATO, M., MATSUSAKA, H., HATTORI, F., IKEUCHI, M., KUBOTA, T., SUNAGAWA, K., HASEGAWA, Y., KURIHARA, T., OIKAWA, S., KINUGAWA, S. e TSUTSUI, H. **Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3**

- prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice.** *Circulation* 113(14): 1779-1786. 2006
- MCARDLE, W. D., KATCH, F. I. e KATCH, V. L. (2011). Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho. Rio de Janeiro – RJ, Editora Guanabara Koogan.
- MCELLIGOTT, M. A., BARRETO, A., JR. e CHAUNG, L. Y. **Effect of continuous and intermittent clenbuterol feeding on rat growth rate and muscle.** *Comp Biochem Physiol C* 92(1): 135-138. 1989
- MCNEEL, R. L. e MERSMANN, H. J. **Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues.** *J Anim Sci* 77(3): 611-621. 1999
- MEDEIROS, A., BACURAU, A. V. N., FERREIRA, J. C. B., BECHARA, L. R. G. e BRUM, P. C. (2010). Adaptações moleculares ao treinamento físico aeróbio na insuficiência cardíaca: músculos cardíaco e esquelético. Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata. C. E. Negrão and A. C. P. Barreto. Barueri, Manole. **3ª Ed.**
- MIDDLEKAUFF, H. R. **Making the case for skeletal myopathy as the major limitation of exercise capacity in heart failure.** *Circ Heart Fail* 3(4): 537-546. 2010
- MILL, J. G., VASSALLO, D. V. e LEITE, C. M. **Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats.** *Braz J Med Biol Res* 24(8): 855-858. 1991
- MINOTTI, J. R., CHRISTOPH, I., OKA, R., WEINER, M. W., WELLS, L. e MASSIE, B. M. **Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance.** *J Clin Invest* 88(6): 2077-2082. 1991
- MIRSHAHI, T., MITTAL, V., ZHANG, H., LINDER, M. E. e LOGOTHETIS, D. E. **Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions.** *J Biol Chem* 277(39): 36345-36350. 2002
- MONTECUCCO, F., BRAUNERSREUTHER, V., LENGLET, S., DELATTRE, B. M., PELLI, G., BUATOIS, V., GUILHOT, F., GALAN, K., VUILLEUMIER, N., FERLIN, W., FISCHER, N., VALLEE, J. P., KOSCO-VILBOIS, M. e MACH, F. **CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice.** *Eur Heart J*. 2011
- MORLEY, J. E., THOMAS, D. R. e WILSON, M. M. **Cachexia: pathophysiology and clinical relevance.** *Am J Clin Nutr* 83(4): 735-743. 2006
- MORRIS, A. J. e MALBON, C. C. **Physiological regulation of G protein-linked signaling.** *Physiol Rev* 79(4): 1373-1430. 1999

- MURGA, C., FUKUHARA, S. e GUTKIND, J. S. **A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt.** J Biol Chem 275(16): 12069-12073. 2000
- MURGA, C., LAGUINGE, L., WETZKER, R., CUADRADO, A. e GUTKIND, J. S. **Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma.** J Biol Chem 273(30): 19080-19085. 1998
- NAVEGANTES, L. C., BAVIERA, A. M. e KETTELHUT, I. C. **The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle.** Braz J Med Biol Res 42(1): 21-28. 2009
- NAVEGANTES, L. C., MIGLIORINI, R. H. e DO CARMO KETTELHUT, I. **Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle.** Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5(3): 281-286. 2002
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., BAVIERA, A. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle.** Am J Physiol Endocrinol Metab 286(4): E642-647. 2004
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP.** Am J Physiol Endocrinol Metab 281(3): E449-454. 2001
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle.** Am J Physiol 277(5 Pt 1): E883-889. 1999
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle.** Am J Physiol Endocrinol Metab 279(3): E663-668. 2000
- NEGRAO, C. E., HAMILTON, M. A., FONAROW, G. C., HAGE, A., MORIGUCHI, J. D. e MIDDLEKAUFF, H. R. **Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(1): H168-174. 2000
- NIEBAUER, J., PFLAUM, C. D., CLARK, A. L., STRASBURGER, C. J., HOOPER, J., POOLE-WILSON, P. A., COATS, A. J. e ANKER, S. D. **Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic**

- deficiency, cytokine and neurohormonal activation.** J Am Coll Cardiol 32(2): 393-397. 1998
- NIKLASSON, M., HOLMANG, A. e LONNROTH, P. **Induction of rat muscle insulin resistance by epinephrine is accompanied by increased interstitial glucose and lactate concentrations.** Diabetologia 41(12): 1467-1473. 1998
- NISHI, I., KAWANO, S., MISAKI, M., HOSHI, T., MASUMI, T., IIDA, K., WATANABE, S. e YAMAGUCHI, I. **Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats.** Heart Vessels 21(4): 251-255. 2006
- OHTA, Y., KINUGAWA, S., MATSUSHIMA, S., ONO, T., SOBIRIN, M. A., INOUE, N., YOKOTA, T., HIRABAYASHI, K. e TSUTSUI, H. **Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 300(5): H1637-1644. 2011
- PALUS, S., SCHUR, R., AKASHI, Y. J., BOCKMEYER, B., DATTA, R., HALEM, H., DONG, J., CULLER, M. D., ADAMS, V., ANKER, S. D. e SPRINGER, J. **Ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, improve body weight and regulate the expression of MuRF-1 and MAFbx in a rat heart failure model.** PLoS One 6(11): e26865. 2011
- PETERS, S. J., DYCK, D. J., BONEN, A. e SPRIET, L. L. **Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle.** Am J Physiol 275(2 Pt 1): E300-309. 1998
- PFEFFER, M., PFEFFER, J., FISHBEIN, M., FLETCHER, P., SPADARO, J., KLONER, R. e BRAUNWALD, E. **Myocardial infarct size and ventricular function in rats.** Circ Res 44(4): 503-512. 1979
- POWERS, S. K., KAVAZIS, A. N. e MCCLUNG, J. M. **Oxidative stress and disuse muscle atrophy.** J Appl Physiol 102(6): 2389-2397. 2007
- PRICE, S. R. **Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy.** Int J Biochem Cell Biol 35(5): 617-628. 2003
- RADLEY, H. G., DE LUCA, A., LYNCH, G. S. e GROUNDS, M. D. **Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions.** Int J Biochem Cell Biol 39(3): 469-477. 2007
- REIKEN, S., LACAMPAGNE, A., ZHOU, H., KHERANI, A., LEHNART, S. E., WARD, C., HUANG, F., GABURJAKOVA, M., GABURJAKOVA, J., ROSEMBLIT, N., WARREN, M. S., HE, K. L., YI, G. H., WANG, J., BURKHOF, D., VASSORT, G. e MARKS, A. R. **PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine**

- receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure.** J Cell Biol 160(6): 919-928. 2003
- REMO, E. F. **Heart failure management. Prevention of pulmonary edema is essential.** Adv Nurse Pract 13(12): 27-28, 30, 62. 2005
- ROCKMAN, H. A., KOCH, W. J. e LEFKOWITZ, R. J. **Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function.** Nature 415(6868): 206-212. 2002
- ROHRER, D. K., CHRUSCINSKI, A., SCHAUBLE, E. H., BERNSTEIN, D. e KOBILKA, B. K. **Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors.** J Biol Chem 274(24): 16701-16708. 1999
- ROLIM, N. P., MATTOS, K. C., BRUM, P. C., BALDO, M. V., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **The decreased oxygen uptake during progressive exercise in ischemia-induced heart failure is due to reduced cardiac output rate.** Braz J Med Biol Res 39(2): 297-304. 2006
- RONDON, E., BRASILEIRO-SANTOS, M. S., MOREIRA, E. D., RONDON, M. U., MATTOS, K. C., COELHO, M. A., SILVA, G. J., BRUM, P. C., FIORINO, P., IRIGOYEN, M. C., KRIEGER, E. M., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Exercise training improves aortic depressor nerve sensitivity in rats with ischemia-induced heart failure.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(6): H2801-2806. 2006
- ROTHWELL, N. J., STOCK, M. J. e SUDERA, D. K. **Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol.** Br J Pharmacol 90(3): 601-607. 1987
- RUBIM, V. S., DRUMOND NETO, C., ROMEO, J. L. e MONTERA, M. W. **[Prognostic value of the Six-Minute Walk Test in heart failure].** Arq Bras Cardiol 86(2): 120-125. 2006
- RYALL, J. G., CHURCH, J. E. e LYNCH, G. S. **Novel role for ss-adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration.** Clin Exp Pharmacol Physiol 37(3): 397-401. 2010
- RYALL, J. G., GREGOREVIC, P., PLANT, D. R., SILENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283(6): R1386-1394. 2002
- RYALL, J. G., PLANT, D. R., GREGOREVIC, P., SILENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats.** J Physiol 555(Pt 1): 175-188. 2004

- RYALL, J. G., SILLENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses.** Br J Pharmacol 147(6): 587-595. 2006
- SAHN, D. J., DEMARIA, A., KISSLO, J. e WEYMAN, A. **Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements.** Circulation 58(6): 1072-1083. 1978
- SANDRI, M. **Signaling in muscle atrophy and hypertrophy.** Physiology (Bethesda) 23: 160-170. 2008
- SANDRI, M., SANDRI, C., GILBERT, A., SKURK, C., CALABRIA, E., PICARD, A., WALSH, K., SCHIAFFINO, S., LECKER, S. H. e GOLDBERG, A. L. **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** Cell 117(3): 399-412. 2004
- SANTOS, A. C., ALVES, M. J., RONDON, M. U., BARRETTO, A. C., MIDDLEKAUFF, H. R. e NEGRAO, C. E. **Sympathetic activation restrains endothelium-mediated muscle vasodilatation in heart failure patients.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(2): H593-599. 2005
- SATO, S., SHIRATO, K., TACHIYASHIKI, K. e IMAIZUMI, K. **Muscle Plasticity and beta(2)-Adrenergic Receptors: Adaptive Responses of beta(2)-Adrenergic Receptor Expression to Muscle Hypertrophy and Atrophy.** J Biomed Biotechnol 2011: 729598. 2011
- SCHMIDT, H. H., SCHURR, C., HEDLER, L. e MAJEWSKI, H. **Local modulation of noradrenaline release in vivo: presynaptic beta 2-adrenoceptors and endogenous adrenaline.** J Cardiovasc Pharmacol 6(4): 641-649. 1984
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., ADAMS, V., LINKE, A., MOBIUS-WINKLER, S., ERBS, S., KRATZSCH, J., HAMBRECHT, R. e SCHULER, G. **Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure.** Basic Res Cardiol 98(4): 267-274. 2003
- SCHULZE, P. C., GIELEN, S., SCHULER, G. e HAMBRECHT, R. **Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training.** Int J Cardiol 85(1): 141-149. 2002
- SERRADJ, N. e JAMON, M. **Age-related changes in the motricity of the inbred mice strains 129/sv and C57BL/6j.** Behav Brain Res 177(1): 80-89. 2007
- SHAM, J. S., JONES, L. R. e MORAD, M. **Phospholamban mediates the beta-adrenergic-enhanced Ca²⁺ uptake in mammalian ventricular myocytes.** Am J Physiol 261(4 Pt 2): H1344-1349. 1991

- SHIOURA, K. M., GEENEN, D. L. e GOLDSPINK, P. H. **Assessment of cardiac function with the pressure-volume conductance system following myocardial infarction in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(5): H2870-2877. 2007
- SIMKO, F. e SIMKO, J. **Heart failure--the reason for or a consequence of failure of the periphery?** *Physiol Res* 45(6): 483-484. 1996
- SNEDDON, A. A., DELDAY, M. I., STEVEN, J. e MALTIN, C. A. **Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(4): E676-682. 2001
- SOLOMON, V. e GOLDBERG, A. L. **Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts.** *J Biol Chem* 271(43): 26690-26697. 1996
- SPURWAY, N. C. **Objective characterization of cells in terms of microscopical parameters: an example from muscle histochemistry.** *The Histochemical Journal* 13(2): 269-317. 1981
- STEVENSON, E. J., GIRESI, P. G., KONCAREVIC, A. e KANDARIAN, S. C. **Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle.** *J Physiol* 551(Pt 1): 33-48. 2003
- STITT, T. N., DRUJAN, D., CLARKE, B. A., PANARO, F., TIMOFEYVA, Y., KLINE, W. O., GONZALEZ, M., YANCOPOULOS, G. D. e GLASS, D. J. **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Mol Cell* 14(3): 395-403. 2004
- STRASSBURG, S., SPRINGER, J. e ANKER, S. D. **Muscle wasting in cardiac cachexia.** *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 1938-1947. 2005
- SUKHANOV, S., SEMPRUN-PRIETO, L., YOSHIDA, T., MICHAEL TABONY, A., HIGASHI, Y., GALVEZ, S. e DELAFONTAINE, P. **Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting.** *Am J Med Sci* 342(2): 143-147. 2011
- SULLIVAN, M. J., GREEN, H. J. e COBB, F. R. **Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure.** *Circulation* 81(2): 518-527. 1990
- TIDBALL, J. G. e SPENCER, M. J. **Calpains and muscular dystrophies.** *Int J Biochem Cell Biol* 32(1): 1-5. 2000
- TIDBALL, J. G. e SPENCER, M. J. **Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse.** *J Physiol* 545(Pt 3): 819-828. 2002
- TISDALE, M. J. **The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting.** *J Support Oncol* 3(3): 209-217. 2005

- TOMCZAK, K. K., MARINESCU, V. D., RAMONI, M. F., SANOUDOU, D., MONTANARO, F., HAN, M., KUNKEL, L. M., KOHANE, I. S. e BEGGS, A. H. **Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation.** FASEB J 18(2): 403-405. 2004
- TOTH, M. J., WARD, K., VAN DER VELDEN, J., MILLER, M. S., VANBUREN, P., LEWINTER, M. M. e ADES, P. A. **Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function.** J Appl Physiol 110(4): 892-900. 2011
- TRAN, H., BRUNET, A., GRIFFITH, E. C. e GREENBERG, M. E. **The many forks in FOXO's road.** Sci STKE 2003(172): RE5. 2003
- TRIPOSKIADIS, F., KARAYANNIS, G., GIAMOUZIS, G., SKOULARIGIS, J., LOURIDAS, G. e BUTLER, J. **The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications.** J Am Coll Cardiol 54(19): 1747-1762. 2009
- VAN HEES, H. W., LI, Y. P., OTTENHEIJM, C. A., JIN, B., PIGMANS, C. J., LINKELS, M., DEKHUIJZEN, P. N. e HEUNKS, L. M. **Proteasome inhibition improves diaphragm function in congestive heart failure rats.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294(6): L1260-1268. 2008
- VENTADOUR, S. e ATTAIX, D. **Mechanisms of skeletal muscle atrophy.** Curr Opin Rheumatol 18(6): 631-635. 2006
- VENTURA-CLAPIER, R., GARNIER, A. e VEKSLER, V. **Energy metabolism in heart failure.** J Physiol 555(Pt 1): 1-13. 2004
- VENTURA-CLAPIER, R., GARNIER, A. e VEKSLER, V. **Energy metabolism in heart failure.** The Journal of Physiology 555(Pt 1): 1-13. 2004
- VERMEEREN, M. A., CREUTZBERG, E. C., SCHOLS, A. M., POSTMA, D. S., PIETERS, W. R., ROLDAAN, A. C. e WOUTERS, E. F. **Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD.** Respir Med 100(8): 1349-1355. 2006
- VESCOVO, G. **Skeletal muscle response to exercise and treatment: another sibyl in the heart failure syndrome?** Int J Cardiol 83(1): 33-34. 2002
- VESCOVO, G. **Skeletal muscle response to exercise and treatment: another sibyl in the heart failure syndrome?** International Journal of Cardiology 83(1): 33-34. 2002
- VIEIRA, N. M., BUENO, C. R., JR., BRANDALISE, V., MORAES, L. V., ZUCCONI, E., SECCO, M., SUZUKI, M. F., CAMARGO, M. M., BARTOLINI, P., BRUM, P. C., VAINZOF, M. e ZATZ, M. **SJL dystrophic mice express a significant amount of**

- human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression.** *Stem Cells* 26(9): 2391-2398. 2008
- VOLTERRANI, M., CLARK, A. L., LUDMAN, P. F., SWAN, J. W., ADAMOPOULOS, S., PIEPOLI, M. e COATS, A. J. **Predictors of exercise capacity in chronic heart failure.** *Eur Heart J* 15(6): 801-809. 1994
- VON HAEHLING, S. e ANKER, S. D. **Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 1(1): 1-5. 2010
- WANG, J., BO, H., MENG, X., WU, Y., BAO, Y. e LI, Y. **A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse.** *Tex Heart Inst J* 33(3): 290-293. 2006
- WENZEL-SEIFERT, K. e SEIFERT, R. **Molecular analysis of beta(2)-adrenoceptor coupling to G(s)-, G(i)-, and G(q)-proteins.** *Mol Pharmacol* 58(5): 954-966. 2000
- WILLIAMS, J. H. e BARNES, W. S. **The positive inotropic effect of epinephrine on skeletal muscle: a brief review.** *Muscle Nerve* 12(12): 968-975. 1989
- WILLIAMS, R. S., CARON, M. G. e DANIEL, K. **Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training.** *Am J Physiol* 246(2 Pt 1): E160-167. 1984
- WILSON, J. R., HANAMANTHU, S., CHOMSKY, D. B. e DAVIS, S. F. **Relationship between exertional symptoms and functional capacity in patients with heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 33(7): 1943-1947. 1999
- WISLOFF, U., STOYLEN, A., LOENNECHEN, J. P., BRUVOLD, M., ROGNMO, O., HARAM, P. M., TJONNA, A. E., HELGERUD, J., SLORDAHL, S. A., LEE, S. J., VIDEM, V., BYE, A., SMITH, G. L., NAJJAR, S. M., ELLINGSEN, O. e SKJAERPE, T. **Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study.** *Circulation* 115(24): 3086-3094. 2007
- XIAO, R. P., AVDONIN, P., ZHOU, Y. Y., CHENG, H., AKHTER, S. A., ESCHENHAGEN, T., LEFKOWITZ, R. J., KOCH, W. J. e LAKATTA, E. G. **Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes.** *Circ Res* 84(1): 43-52. 1999
- XIAO, R. P., HOHL, C., ALTSCHULD, R., JONES, L., LIVINGSTON, B., ZIMAN, B., TANTINI, B. e LAKATTA, E. G. **Beta 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca²⁺ dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation.** *J Biol Chem* 269(29): 19151-19156. 1994

- XIAO, R. P. e LAKATTA, E. G. **Beta 1-adrenoceptor stimulation and beta 2-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca²⁺, and Ca²⁺ current in single rat ventricular cells.** Circ Res 73(2): 286-300. 1993
- YANG, F., LIU, Y. H., YANG, X. P., XU, J., KAPKE, A. e CARRETERO, O. A. **Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice.** Exp Physiol 87(5): 547-555. 2002
- YANG, Y. T. e MCELLIGOTT, M. A. **Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue.** Biochem J 261(1): 1-10. 1989
- ZANNAD, F., STOUGH, W. G., PITT, B., CLELAND, J. G., ADAMS, K. F., GELLER, N. L., TORP-PEDERSEN, C., KIRWAN, B. A. e FOLLATH, F. **Heart failure as an endpoint in heart failure and non-heart failure cardiovascular clinical trials: the need for a consensus definition.** Eur Heart J 29(3): 413-421. 2008
- ZONG, C., GOMES, A. V., DREWS, O., LI, X., YOUNG, G. W., BERHANE, B., QIAO, X., FRENCH, S. W., BARDAG-GORCE, F. e PING, P. **Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners.** Circ Res 99(4): 372-380. 2006
- ZORNOFF, L. A., PAIVA, S. A., MINICUCCI, M. F. e SPADARO, J. **Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model.** Arq Bras Cardiol 93(4): 434-440, 426-432. 2009

ANEXOS

ANEXO I: Parâmetros ecocardiográficos. Fração de encurtamento (FEnc) (%), diâmetro sistólico (DSFVE) e diastólico (DDFVE) finais do ventrículo esquerdo, espessura do septo interventricular ao final da sístole (SIVS) e diástole (SIVD), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES) e diástole (PPVED) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF, expressos em mm.

Grupo	FEnc	DSFVE	DDFVE	SIVS	SIVD	PPVES	PPVED
CO SHAM	59	1,44	3,50	1,00	0,34	1,20	0,51
CO SHAM	60	1,44	3,60	0,59	0,41	1,30	0,68
CO SHAM	44	1,78	3,20	1,00	0,42	0,85	0,51
CO SHAM	53	1,69	3,60	0,70	0,34	1,10	0,42
CO SHAM	47	1,86	3,50	0,93	0,50	0,85	0,34
CO SHAM	42	2,50	4,30	0,68	0,39	0,68	0,42
CO SHAM	50	1,44	2,88	0,76	0,34	0,85	0,51
CO SHAM	57	1,36	3,14	0,76	0,34	0,59	0,42
CO SHAM	55	1,19	2,63	0,59	0,42	0,85	0,34
CO SHAM	43	1,44	2,54	0,59	0,34	0,68	0,42
CO SHAM	36	1,78	2,80	0,51	0,34	0,85	0,42
CO SHAM	40	1,69	2,80	0,93	0,42	0,93	0,42
CO SHAM	44	1,86	3,31	0,68	0,34	0,76	0,42
CO SHAM	43	1,69	2,97	0,59	0,34	0,59	0,34
média	48	1,65	3,20	0,74	0,38	0,86	0,44
desvio padrão	7	0,31	0,46	0,16	0,05	0,21	0,09
erro padrão	2	0,08	0,12	0,04	0,01	0,05	0,02
CO INF	19	2,90	3,60	1,00	0,80	1,19	1,10
CO INF	22	3,20	4,10	0,90	0,70	0,85	0,90
CO INF	24	2,50	3,30	0,90	0,80	0,85	1,00
CO INF	16	4,10	4,90	0,68	0,70	1,19	1,10
CO INF	23	3,30	4,30	0,76	0,90	1,10	0,76
CO INF	24	2,90	3,80	0,80	0,70	1,00	0,85
CO INF	34	2,97	4,49	0,68	0,42	1,10	0,59
CO INF	25	3,22	4,32	1,61	0,42	1,36	0,42
CO INF	34	2,37	3,81	0,85	0,59	0,76	0,76
CO INF	32	3,22	4,75	0,93	0,51	1,36	1,02
CO INF	29	3,31	4,66	1,10	0,59	1,27	0,68
média	26	3,09	4,18	0,93	0,65	1,09	0,83
desvio padrão	6	0,44	0,49	0,25	0,15	0,20	0,21
erro padrão	2	0,13	0,15	0,07	0,05	0,06	0,06
KO SHAM	40	1,80	3,00	0,90	0,42	0,76	0,42
KO SHAM	50	1,71	3,40	0,90	0,42	0,76	0,59
KO SHAM	49	1,86	3,64	0,76	0,42	0,93	0,51
KO SHAM	37	2,02	3,22	0,68	0,42	0,85	0,59
KO SHAM	49	1,69	3,31	1,02	0,42	1,19	0,51
KO SHAM	43	1,61	2,80	0,68	0,34	0,68	0,34
KO SHAM	41	1,69	2,88	0,85	0,34	0,76	0,42
KO SHAM	43	1,61	2,80	0,85	0,51	0,76	0,59
KO SHAM	53	1,27	2,71	0,76	0,42	0,76	0,59
KO SHAM	51	1,69	3,47	0,95	0,42	1,10	0,68
KO SHAM	44	1,58	2,80	0,76	0,42	0,85	0,34
KO SHAM	32	2,29	3,39	0,85	0,42	0,59	0,42
KO SHAM	45	1,78	3,22	1,02	0,42	1,02	0,59
KO SHAM	47	1,78	3,39	0,93	0,51	0,76	0,59
média	45	1,74	3,15	0,85	0,42	0,84	0,51
desvio padrão	6	0,22	0,29	0,11	0,05	0,16	0,10
erro padrão	1	0,06	0,08	0,03	0,01	0,04	0,03
KO INF	22	3,89	5,00	0,68	0,51	1,40	0,59
KO INF	17	3,40	4,10	0,68	0,42	0,91	0,51
KO INF	15	4,10	4,80	0,71	0,68	1,30	0,76
KO INF	25	3,64	4,83	0,59	0,34	1,61	0,85
KO INF	26	3,14	4,24	0,68	0,51	0,85	0,68
KO INF	24	3,56	4,66	0,68	0,51	0,85	0,59
KO INF	21	3,47	4,41	0,76	0,51	1,19	0,76
KO INF	21	3,90	4,92	0,68	0,68	1,10	0,85
KO INF	24	3,81	5,00	0,68	0,42	1,10	0,51
KO INF	19	4,24	5,25	0,76	0,68	1,10	0,76
KO INF	25	4,24	5,68	0,68	0,42	0,93	0,68
KO INF	28	3,22	4,49	0,76	0,42	0,93	0,59
média	22	3,72	4,78	0,70	0,51	1,11	0,68
desvio padrão	4	0,36	0,42	0,05	0,11	0,23	0,12
erro padrão	1	0,10	0,12	0,01	0,03	0,07	0,03

ANEXO II: Área de infarto (%) dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF
	0,0	28,8	0,0	32,4
	0,0	36,7	0,0	30,6
	0,0	25,8	0,0	24,6
	0,0	54,8	0,0	59,2
	0,0	42,0	0,0	63,3
	0,0	30,6	0,0	26,8
	0,0	41,4	0,0	24,0
	0,0	32,5	0,0	43,8
	0,0	39,9	0,0	48,1
	0,0	26,2	0,0	56,9
	0,0	26,2	0,0	33,1
	0,0		0,0	30,4
	0,0		0,0	
	0,0		0,0	
média	0	35	0	39
desvio padrão	0	9	0	14
erro padrão	0	3	0	4

ANEXO III: Pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM, KO INF.

	Pressão arterial					Frequência cardíaca			
	CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF		CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF
	119	102	116	104		661	624	505	494
	105	92	109	94		515	463	489	549
	102	106	106	122		486	602	491	479
	90	96	113	114		450	608	515	469
	111	92	108	106		501	620	493	455
	129	98	106	106		526	466	517	557
		108	109	103			570	501	499
média	109	99	109	107		523	565	502	500
desvio padrão	14	6	4	9		72	71	11	39
erro padrão	6	2	1	3		30	27	4	15

ANEXO IV: Concentrações plasmáticas (pg/mL) de noradrenalina e adrenalina dos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	Noradrenalina	Adrenalina
CO SHAM	5354	686
CO SHAM	6089	3753
CO SHAM	5804	1583
CO SHAM	11153	3648
CO SHAM	8951	14426
CO SHAM	6393	3607
CO SHAM	7197	4496
CO SHAM	8455	3073
CO SHAM	5077	3114
CO SHAM	10121	7415
média	7459	4580
desvio padrão	2105	3888
erro padrão	2359	1448
CO INF	11569	28762
CO INF	16609	44095
CO INF	17913	25342
CO INF	14235	10038
CO INF	15594	2731
CO INF	18459	25259
CO INF	7491	5073
CO INF	8749	5520
CO INF	6091	2837
CO INF	14468	25268
CO INF	7913	7489
média	12645	16583
desvio padrão	4473	13762
erro padrão	3813	5000
KO SHAM	8312	4633
KO SHAM	9198	3560
KO SHAM	6999	2831
KO SHAM	4365	10897
KO SHAM	9799	4507
KO SHAM	6214	8257
KO SHAM	8615	4603
KO SHAM	6662	16795
KO SHAM	9725	4832
KO SHAM	6557	4569
KO SHAM	9803	7114
KO SHAM	6720	4002
KO SHAM	8814	11543
KO SHAM	9605	7915
média	7956	6861
desvio padrão	1698	3925
erro padrão	2126	1834
KO INF	6932	17336
KO INF	10934	8331
KO INF	16775	26187
KO INF	10252	16249
KO INF	15948	16137
KO INF	6552	4541
KO INF	9859	4115
KO INF	7682	23098
KO INF	13389	
média	10925	14499
desvio padrão	3753	8189
erro padrão	3642	5126

ANEXO V: Massas teciduais corrigidas pela massa corporal (mg/g) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	M. Corporal	M. Coração	M. Pulmão	M. úmida/seca pulmão	Sóleo	Plantar	M. úmida/seca tibial	Epididimal	Retroperitoneal
CO SHAM	32,8	3,8	5,6	4,7	0,32	0,48	4,44	10,2	4,1
CO SHAM	34,1	3,8	5,7	5,1	0,21	0,51	4,38	7,3	2,5
CO SHAM	34,4	3,5	5,3	4,6	0,20	0,38	4,18	8,8	4,1
CO SHAM	35,7	3,3	5,3	4,6	0,21	0,52	4,24	19,4	3,6
CO SHAM	36,8	3,9	4,7	4,9	0,27	0,49	4,14	18,4	4,0
CO SHAM	37,5	3,6	5,5	4,8	0,20	0,43	3,97	19,6	7,0
CO SHAM	36,5	3,2	5,5	4,8	0,24	0,33	3,99	21,3	7,6
CO SHAM	27,5	3,8	6,2	4,3	0,22	0,56	3,48	19,6	10,9
CO SHAM	30,5	3,8	4,9	4,3	0,20	0,40	3,61	13,4	5,9
CO SHAM	31,4	4,2	6,9	4,0	0,21	0,48	3,86	15,8	7,1
CO SHAM	29,2	3,9	5,6	4,6	0,24	0,50	3,54	18,1	9,3
CO SHAM	29,4	4,1	5,7	4,0	0,24	0,69	3,64	17,1	10,0
CO SHAM	35,5	3,7	4,9	3,6	0,10	0,44	3,73	25,9	19,3
CO SHAM	30,0	4,1	5,9	4,2	0,22	0,36	3,35	12,2	6,5
média	33	3,8	5,6	4,5	0,22	0,47	3,90	16,2	7,3
desvio padrão	3	0,3	0,5	0,4	0,05	0,09	0,34	5,1	4,1
erro padrão	1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,02	0,09	1,3	1,1
CO INF	36,9	7,0	8,8	6,0	0,21	0,59	4,48	7,3	3,5
CO INF	34,3	5,2	6,3	4,8	0,34	0,57	4,09	9,2	4,8
CO INF	39,8	6,1	6,0	4,8	0,33	0,42	4,11	8,5	4,0
CO INF	31,4	5,0	5,4	4,6	0,11	0,68	3,45	7,6	3,6
CO INF	31,9	6,1	5,6	4,6	0,18	0,65	3,86	9,6	2,8
CO INF	30,4	5,7	5,9	4,5	0,18	0,47	3,72	11,4	2,5
CO INF	30,6	4,8	5,9	4,7	0,25	0,54	4,10	8,7	3,1
CO INF	18,5	7,9	14,6	4,8	0,26	0,29	3,84	10,9	3,4
CO INF	33,4	5,1	4,7	4,2	0,18	0,40	3,41	9,7	2,8
CO INF	32,2	5,8	8,1	5,0	0,21	0,47	3,90	14,4	8,4
CO INF	29,5	5,0	6,4	4,2	0,21	0,46	3,59	13,7	4,1
média	32	5,8	7,1	4,7	0,22	0,50	3,87	10,1	3,9
desvio padrão	5	0,9	2,6	0,5	0,06	0,11	0,30	2,2	1,6
erro padrão	2	0,3	0,8	0,1	0,02	0,03	0,09	0,7	0,5
KO SHAM	32,8	3,5	5,7	4,7	0,17	0,43	3,70	15,8	6,4
KO SHAM	32,3	3,8	7,6	3,6	0,21	0,39	3,80	12,9	3,5
KO SHAM	33,6	2,6	5,7	4,8	0,15	0,56	3,84	19,4	4,8
KO SHAM	31,7	2,7	7,5	4,6	0,16	0,53	3,88	19,8	7,3
KO SHAM	33,6	2,7	3,2	4,5	0,21	0,68	3,87	23,0	10,5
KO SHAM	31,4	3,4	5,7	4,2	0,16	0,45	3,71	19,4	9,7
KO SHAM	29,2	2,8	4,5	4,5	0,16	0,46	3,80	15,6	5,9
KO SHAM	30,2	2,8	5,9	3,3	0,13	0,45	3,62	26,5	14,6
KO SHAM	34,4	3,3	5,3	4,3	0,20	0,51	3,61	26,2	12,9
KO SHAM	32,5	3,1	4,7	4,2	0,18	0,58	3,90	20,3	2,7
KO SHAM	36,6	2,6	6,7	3,0	0,21	0,43	3,77	24,8	15,3
KO SHAM	36,8	3,5	5,5	4,5	0,21	0,55	3,57	33,1	20,6
KO SHAM	34,3	2,7	4,8	3,9	0,20	0,45	3,65	37,7	23,3
KO SHAM	30,4	2,9	7,1	4,3	0,13	0,34	3,45	16,0	8,2
média	33	3,0	5,7	4,2	0,18	0,49	3,73	22,2	10,4
desvio padrão	2	0,4	1,2	0,5	0,03	0,08	0,13	6,7	6,0
erro padrão	1	0,1	0,3	0,1	0,01	0,02	0,03	1,8	1,6
KO INF	30,5	4,5	8,3	4,9	0,29	0,55	4,28	27,3	10,1
KO INF	36,6	6,0	5,6	5,3	0,26	0,49	4,36	16,8	7,8
KO INF	30,9	4,1	5,8	4,8	0,17	0,59	4,18	17,7	4,8
KO INF	27,2	8,5	7,8	5,6	0,19	0,54	4,37	4,7	1,2
KO INF	32,0	7,9	4,8	5,2	0,29	0,40	4,24	18,1	14,1
KO INF	34,9	4,4	8,2	3,5	0,15	0,42	3,54	21,2	15,9
KO INF	31,0	4,1	6,4	4,2	0,17	0,53	3,70	18,6	6,4
KO INF	29,9	3,7	7,2	4,2	0,16	0,31	3,68	31,7	11,4
KO INF	33,1	4,9	9,9	3,7	0,20	0,44	3,60	10,4	5,8
KO INF	28,2	4,2	9,1	4,4	0,19	0,41	3,71	20,8	15,7
KO INF	28,7	5,4	7,6	4,1	0,21	0,41	3,76	8,6	2,2
KO INF	31,7	5,0	12,5	4,8	0,16		3,78	11,5	4,4
média	31	5,2	7,8	4,6	0,20	0,46	3,93	17,3	8,3
desvio padrão	3	1,5	2,0	0,6	0,05	0,08	0,31	7,4	4,9
erro padrão	1	0,4	0,6	0,2	0,01	0,02	0,09	2,1	1,4

ANEXO VI: Distância percorrida (m) pelos animais CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF
	585,0	425,0	936,0	323,1
	598,8	458,0	633,0	375,3
	564,1	350,1	951,0	231,1
	645,6	369,5	600,0	474,0
	679,8	388,8	951,0	394,7
	512,4	488,0	740,1	433,5
	597,2	471,0	813,8	648,5
	554,2	425,2	1121,0	491,5
	736,9	515,3	870,0	244,2
	554,2	452,0	603,8	422,9
	651,0	594,4	809,2	457,6
	755,5		846,9	598,1
	727,4		887,7	
	763,2		870,0	
média	638	449	831	425
desvio padrão	80	66	142	120
erro padrão	21	20	38	35

ANEXO VII: Desempenho atingido nos testes Rota Rod (segundos) e deambulação (comprimento da passada corrigida pelo comprimento naso-anal) pelos animais dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	Rota Rod					Deambulação			
	CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF		CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF
	76	47	32	73		0,64	0,62	0,66	0,59
	62	109	141	137		0,57	0,66	0,68	0,64
	33	78	92	160		0,69	0,61	0,74	0,58
	60	128	69	113		0,55	0,62	0,67	0,50
	49	6	135	57		0,61	0,86	0,66	0,62
	93	20	107	75		0,65	0,77	0,67	0,67
	74	18	59	119		0,70	0,43	0,75	0,63
	9	43	164	52		0,66	0,54	0,65	0,60
	100	46	87	70		0,65	0,62	0,68	0,56
	40		128	69		0,71	0,60	0,71	0,56
			100	63			0,55	0,71	0,64
			62					0,70	
média	60	55	98	90		0,64	0,63	0,69	0,60
desvio padrão	26	40	37	35		0,05	0,11	0,03	0,05
erro padrão	8	13	11	10		0,02	0,03	0,01	0,01

ANEXO VIII: Concentração de glicose plasmática (mg/dL) e conteúdo de glicogênio muscular ($\mu\text{g/g}$) dos grupos CO SHAM, CO INF, KO SHAM e KO INF.

	Glicose					Glicogênio			
	CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF		CO SHAM	CO INF	KO SHAM	KO INF
	161	192	124	112		81	27	105	85
	179	192	110	147		55	18	154	31
	222	172	149	118		41	55	71	33
	183	179	165	134		64	12	60	63
	198	149	110	127		59	18	87	32
	178	163	145	141		54	20	153	120
	161	182	132	147		76	47	161	76
	151	167	159	122		142	76	71	113
	150	166	125	150		117		148	
		142	132	164					
			143						
			127						
média	176	170	135	136		77	34	112	69
desvio padrão	22	16	17	16		31	21	39	34
erro padrão	7	5	5	5		10	8	13	12