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

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS QUE TRANSPORTAM Ca^{2+} E PARTICIPAM DO
SISTEMA PROTEOLÍTICO DEPENDENTE DE Ca^{2+} NA
MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL
DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

Carlos Roberto Bueno Júnior

**SÃO PAULO
2009**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUE
TRANSPORTAM Ca^{2+} E PARTICIPAM DO SISTEMA PROTEOLÍTICO
DEPENDENTE DE Ca^{2+} NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

CARLOS ROBERTO BUENO JÚNIOR

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PATRICIA CHAKUR BRUM

AGRADECIMENTOS

Quando comecei a pensar nas pessoas/instituições que deveria agradecer nesse momento, veio à mente vários nomes - então decidi agrupá-los em “categorias”. A próxima dúvida foi a ordem da lista de agradecimentos: como cada pessoa/instituição tem um papel diferente, acredito que ficaria difícil reunir critérios para estabelecer tal ordem. Para ser “metodologicamente” correto, determinei essa ordem aleatoriamente por meio de sorteio. Portanto, agradeço imensamente:

- Os colegas de outros laboratórios, com os quais desenvolvo trabalhos, discuto resultados e/ou aprendo técnicas de pesquisa - além da convivência. São eles: Natássia, Denise, Marcos, Mariane, Éder e Mayana (Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB, USP); Talita e Elen (Departamento de Anatomia, ICB, USP); Aline, Enéas, Pedro, Mariana, Ricardo e Silvia (Laboratório de Eletrofisiologia Celular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG); Luciana e Paula (Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia, Departamento de Cirurgia, FMVZ, USP); Ana Paula, Gisele, Camilla e Luciana (Laboratório de Fisiologia Vascular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, USP);

- A minha família pelo apoio, incentivo e exemplos de determinação, força de vontade e persistência, em especial minha mãe Regina, meu pai Carlos e meus irmãos André e Renan;

- A minha orientadora Patricia Chakur Brum, uma funcionária pública extremamente motivada e batalhadora com a qual aprendo muito a cada dia, dentro e fora da EEFÉ, especialmente em relação ao pensamento crítico, à auto-cobrança e ao equilíbrio em vários aspectos da vida - as nossas discussões certamente foram extremamente importantes para a minha formação, pois estou certo de que só aprendemos e nos desenvolvemos quando somos expostos a algo diferente do que acreditávamos ou que não conhecíamos;

- Os meus amigos de São Paulo pela companhia e aprendizados, em especial os que conheci fora da universidade, os colegas de classe na EEFE e os membros dos projetos que participei na USP, como o Estação USP 2005, o Estação USP 2006, a Liga de Insuficiência Cardíaca da Faculdade de Medicina, o projeto de desenvolvimento físico e motor com crianças de Muzambinho, o Exercício e Coração e o PET (Programa de Educação Tutorial);

- O pessoal dos Laboratórios de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício e Bioquímica da Atividade Motora da EEFE pelos ensinamentos nas técnicas experimentais, pelas discussões científicas e não científicas, e pela convivência no laboratório e nos congressos: Luiz, Aline, Júlio, Natale, Ellena, Débora, Jan, Marcelo, Maíra, Léo, Guga, Adriana, Telma, Andréa, Alessandra, Valério, Fernanda, Nara, Tiago, Flávio, Rodrigo, Gabriela, Diogo, Éverton, Diego, Stéphan, Vanessa e Érika;

- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (bolsas e recursos para o desenvolvimento dos projetos científicos) desde a iniciação científica;

- Os meus amigos de Carmo do Rio Claro (MG), em especial os colegas e professores das escolas onde estudei (Escola Estadual Geraldo de Andrade Vilela e Escola Estadual Monsenhor Mário Araújo Guimarães) e das equipes de vôlei e de futebol da cidade, com os quais tirei várias lições de vida;

- Os professores e funcionários da EEFE pelos serviços, informações e conhecimentos, em especial aqueles com os quais tive maior convivência e aprendi fora da sala de aula, em projetos de pesquisa, ensino e extensão, em festas e em congressos: Luciano, Cláudia, Júlio, Edilamar e Paulo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMO.....	xil
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Insuficiência cardíaca: aspectos históricos.....	2
2.2 Insuficiência cardíaca e musculatura esquelética.....	3
2.3 Proteínas relacionadas ao transporte de Ca^{2+} e à degradação protéica decorrente de alterações no transporte de Ca^{2+} na musculatura esquelética.....	5
2.4 Treinamento físico de insuficiência cardíaca.....	7
2.5 Modelo de insuficiência cardíaca.....	9
3 JUSTIFICATIVA.....	11
4 OBJETIVOS.....	13

4.1	Objetivo geral.....	13
4.2	Objetivos específicos.....	13
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
5.1	Amostra.....	14
5.2	Testes de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular.....	15
5.3	Protocolo de treinamento físico.....	17
5.4	Coleta de tecidos.....	18
5.5	Análise histológica.....	19
5.6	Análise da expressão protéica.....	19
5.7	Atividade das calpaínas.....	21
6	ANÁLISE DOS DADOS.....	21
7	RESULTADOS.....	22
8	DISCUSSÃO.....	38
9	LIMITAÇÕES.....	52
10	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Caracterização do modelo experimental de insuficiência cardíaca.....	24
TABELA 2	Massa corporal e edema pulmonar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados.....	26
TABELA 3	Massa dos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados.....	28

	insuficiência cardíaca, sedentários e treinados.....	
FIGURA 9	Expressão de proteínas relacionadas à proteólise dependente de Ca^{2+} avaliada por <i>Western blot</i> nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados.....	36
FIGURA 10	Atividade da via proteolítica dependente de Ca^{2+} avaliada por <i>Western blot</i> nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados.....	38
FIGURA 11	Caracterização da musculatura esquelética apendicular em animais controle (CO), insuficiência cardíaca (IC) e controle com restrição alimentar (COR).....	41

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AgRP	neuropeptídeos orexígenos relacionados a <i>agouti</i>
Ca ²⁺	íon cálcio
CO	camundongos controle
COTF	camundongos controle com treinamento físico
DHPR	receptor para diidropiridina
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECA	enzima conversora de angiotensina
GH	hormônio do crescimento
GHS-1aR	receptores estimuladores da liberação de hormônio do crescimento 1a
IC	insuficiência cardíaca ou camundongos com insuficiência cardíaca
ICTF	camundongos com insuficiência cardíaca e treinamento físico
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
NCX	trocador Na ⁺ -Ca ²⁺

NPY	neuropeptídeo Y
POMC	pró-ópio-melanocortina
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RYR	receptor para rianodina
SERCA	sarco endo-retículo Ca^{2+} -ATPase
TNF- α	fator de necrose tumoral α

LISTA DE ANEXO

	Página
ANEXO 1	
Dados individuais.....	71

RESUMO

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUE TRANSPORTAM Ca^{2+} E PARTICIPAM DO SISTEMA PROTEOLÍTICO DEPENDENTE DE Ca^{2+} NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Autor: CARLOS ROBERTO BUENO JÚNIOR

Orientadora: PROFA. DRA. PATRICIA CHAKUR BRUM

Recentemente foi demonstrado que na insuficiência cardíaca (IC), a via final das doenças circulatórias e a maior causa de internação em idosos no Brasil, os danos morfo-funcionais da musculatura esquelética representam um preditor independente de mortalidade. Por outro lado, é conhecido que o treinamento físico aeróbico previne o aparecimento desses prejuízos, que potencialmente podem ter relação com alterações no transporte intracelular de Ca^{2+} . Nesse sentido, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito da IC e do treinamento físico aeróbico na IC em relação à função da musculatura esquelética, à expressão de proteínas que transportam Ca^{2+} no sóleo e no plantar (DHPR α 1, DHPR α 2, DHPR β 1, RYR, NCX, SERCA 1, SERCA 2, parvalbumina) e à atividade da via proteolítica dependente deste íon nestes músculos (calpaína e calpastatina). Foram utilizados camundongos machos C57B7/6J controle e com inativação dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos com 7 meses de idade, quando estes apresentam IC induzida por hiperatividade simpática e 50% de mortalidade. A função muscular foi avaliada pelos testes de deambulação e resistência à inclinação. Tanto a expressão protéica como a

atividade proteolítica foram avaliadas por *Western blot*. Os animais com IC apresentaram disfunção muscular, prejuízos nas proteínas relacionadas ao transiente de Ca^{2+} tanto no sóleo como no plantar, além de alterações na via proteolítica dependente deste íon em relação aos controle. O treinamento físico, por sua vez, preveniu o aparecimento dessas alterações funcionais e moleculares nos animais com IC. Em conclusão, o treinamento físico aeróbico mostrou-se uma terapia efetiva para a síndrome.

Palavras-chave: insuficiência cardíaca, musculatura esquelética, treinamento físico, transiente intracelular de Ca^{2+} .

ABSTRACT**EFFECT OF EXERCISE TRAINING ON Ca^{2+} HANDLING AND Ca^{2+} -INDUCED
PROTEOLYSIS IN SKELETAL MUSCULATURE OF HEART FAILURE
EXPERIMENTAL MODEL****Author: CARLOS ROBERTO BUENO JÚNIOR****Adviser: PROFA. DRA. PATRICIA CHAKUR BRUM**

Heart failure (HF) is a clinical syndrome with poor prognosis characterized by exercise intolerance, early fatigue and skeletal muscle myopathy, which has been considered an independent predictor of mortality. Conversely, aerobic exercise training prevents skeletal muscle dysfunction, which might be related to altered intracellular Ca^{2+} handling. Therefore, we tested whether HF would lead to alterations in skeletal musculature function related to changes in Ca^{2+} handling proteins expression (DHPR α 1, DHPR α 2, DHPR β 1, RYR, NCX, SERCA 1, SERCA 2, parvalbumin) and activity of the Ca^{2+} -dependent proteolysis (calpain and calpastatin) in soleus and plantaris muscles. The potential role of exercise training in preventing Ca^{2+} handling alterations was also studied. Male wild type and α_{2A} e α_{2C} adrenoceptor knockout (KO) mice on a C56BL/6J genetic background were studied at 7 months of age, when KO mice display HF and skeletal muscle myopathy associated with sympathetic hyperactivity and 50% of mortality. KO mice displayed skeletal muscle dysfunction paralleled by altered Ca^{2+} handling protein expression and Ca^{2+} -

induced proteolysis in both soleus and plantaris. Interestingly, exercise training prevented skeletal muscle dysfunction and Ca^{2+} -induced proteolysis in both soleus and plantaris. Collectively, we provide evidence that improved net balance of Ca^{2+} handling proteins and decreased Ca^{2+} -induced proteolysis upon exercise training is, at least in part, a compensatory mechanism against skeletal muscle myopathy of sympathetic hyperactivity-induced HF.

Keywords: heart failure, skeletal muscle, exercise training, intracellular Ca^{2+} handling.

1 Introdução

Os avanços científicos e tecnológicos na área da saúde, aliados ao estilo de vida preponderante da sociedade moderna, no qual o sedentarismo, o fumo, a obesidade, as dislipidemias, a diabetes e a hipertensão arterial são freqüentes, fizeram com que as doenças infecciosas e parasitárias, que no passado eram responsáveis por grande parte da mortalidade em todo o mundo, passassem a ser gradativamente substituídas pelas doenças crônico-degenerativas, que cada vez mais se apresentam como um grande desafio à humanidade. Segundo PRATA (1989), por exemplo, enquanto em 1930 as doenças infecciosas e parasitárias eram responsáveis por 46% e as doenças do aparelho circulatório por 12% dos óbitos no Brasil, em 1985 esses números foram 7% e 33%, respectivamente.

As doenças cardiovasculares, que são crônico-degenerativas, são a principal causa de morte no mundo atualmente, sendo responsáveis por cerca de 30% de todos os óbitos, e tem a insuficiência cardíaca como a síndrome final da maioria delas. Por outro lado, o exercício físico regular é considerado fundamental no tratamento não-farmacológico dessa síndrome (WITHAM, STRUTHERS & MCMURDO, 2003).

A relação do treinamento físico com a insuficiência cardíaca torna-se ainda mais importante na medida em que entendemos que a intolerância aos esforços físicos, uma das principais características da insuficiência cardíaca, usada como critério para classificações do nível de gravidade da síndrome e muitas vezes o sintoma limitante, está longe de ser apenas uma consequência da disfunção cardíaca, pois foi demonstrado que a correlação entre o nível de prejuízo nas variáveis cardíacas e o grau de tal intolerância é baixa. A partir desses achados, mudanças intrínsecas à musculatura esquelética começaram a ser investigadas e foi demonstrado que há correlação entre o nível dessa intolerância aos esforços físicos e o grau de prejuízo funcional da musculatura esquelética (FRANCIOSA, PARK & LEVINE, 1981; WILSON, RAYOS, YEOH, GOTHARD & BAK, 1995; MINOTTI, CHRISTOPH, OKA, WEINER, WELLS & MASSIE, 1991; VOLTERRANI, CLARK, LUDMAN, SWAN, ADAMAPOULOS, PIEPOLI & COATS, 1994). Além disso, o aumento no débito cardíaco agudo provocado por drogas não melhora a tolerância aos esforços físicos na insuficiência cardíaca (WILSON, 1995; DAYER,

HOPKINSON, ROSS, JONVILLE, SHARSHAR, KEARNEY, MOXHAM & POLKEY, 2006). Por fim, JONDEAU, KATZ, ZOHMAN, GOLDBERGER, MCCARTHY, BOURDARIAS & LEJEMTEL (1992) mostraram que os danos periféricos, e não a redução no débito cardíaco, limitam a maioria dos pacientes com insuficiência cardíaca - eles viram que a frequência cardíaca e o consumo de oxigênio aumentaram na maioria dos pacientes adicionando um exercício com os membros superiores após o consumo de oxigênio ter atingido platô em exercício realizado em bicicleta ergométrica até a exaustão. Isso evidencia a importância de se estudar a musculatura esquelética na insuficiência cardíaca, visando maior entendimento da síndrome e de seus tratamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência cardíaca: aspectos históricos

Uma das definições mais antigas de insuficiência cardíaca é a de Thomas Lewis, de 1933, segundo a qual a síndrome é uma condição na qual o coração falha em liberar seus conteúdos adequadamente (DAVIS, HOBBS & LIP, 2000).

Descrições da insuficiência cardíaca existiam nas sociedades antigas egípcia, grega e índica, e os romanos antigos usavam a planta *foxglove* como medicamento para tal síndrome. O nome científico dessa planta é *Digitalis purpurea* e tal nome deu origem a uma classe de medicamentos utilizada na terapia da síndrome que aumenta o poder de contração do coração, os digitálicos. Pouco entendimento da natureza desta condição podia existir até que William Harvey descreveu a circulação sanguínea em 1628. A descoberta de Wilhelm Röntgen do raio-X em 1895 e o desenvolvimento da eletrocardiografia também na década de 1890 possibilitaram avanços na investigação da síndrome.

O advento da ecocardiografia e da cateterização cardíaca, aliados à medicina nuclear, têm melhorado o diagnóstico e o tratamento dos pacientes com insuficiência cardíaca. Sangrias e sanguessugas foram utilizadas por séculos no tratamento da síndrome e William Withering publicou suas considerações dos benefícios dos medicamentos digitálicos em 1785. No século XIX e início do século

XX, a insuficiência cardíaca associada com a retenção de fluido era tratada com os tubos de *Southey*, que eram inseridos nos edemas periféricos, permitindo alguma drenagem. Os diuréticos com mercúrio, utilizados desde 1920, foram associados a uma grande toxicidade, incomum nos diuréticos tiazídicos, que foram introduzidos em 1958. Vasodilatadores não eram amplamente utilizados até o desenvolvimento dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) na década de 1970.

Outro marco foi o estudo CONSENSUS-1, a primeira investigação científica cooperativa na Escandinávia do Norte, publicado em 1987, que mostrou benefícios inequívocos de sobrevivência com o medicamento enalapril, um inibidor da ECA, em pacientes com insuficiência cardíaca. Finalmente, em 1995 a Sociedade Européia de Cardiologia publicou um guia para o diagnóstico da doença (DAVIS et al., 2000). Apesar de fugir do escopo do presente trabalho discutir os tratamentos farmacológicos da síndrome, vale destacar que além das drogas supracitadas, também são utilizados antagonistas dos receptores β -adrenérgicos, antagonistas dos receptores de angiotensina II (subtipo AT1) e inibidores de aldosterona.

O desenvolvimento de fármacos, instrumentos, equipamentos e procedimentos supracitados atualmente tem como consequência um melhor diagnóstico e prognóstico dos pacientes. Além disso, todo esse processo histórico proporcionou um melhor entendimento da fisiopatologia da doença.

2.2 Insuficiência cardíaca e musculatura esquelética

Atualmente a insuficiência cardíaca é caracterizada como uma síndrome clínica e a via final de grande parte das doenças circulatórias, sendo caracterizada por: falência no suprimento adequado de sangue em relação ao retorno venoso e às necessidades metabólicas teciduais (MARKS, 2003), mau prognóstico, fadiga, dispnéia, grande limitação aos esforços físicos (COLLUCI, 1998; LUNDE, SJAASTAD, SCHIOTZ THORUD & SEJERSTED, 2001), remodelamento cardíaco (hipertrofia, dilatação da câmara, apoptose e aumento na fração de colágeno), disfunção endotelial, hiperatividade simpática, retenção de fluido, exacerbação da atividade dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e argininina-vasopressina (COHN, FERRARI & SHARPE, 2000) e alterações no perfil metabólico

e morfológico dos músculos esqueléticos (FERRARI & CECONI, 1998; DREXLER, HAYOZ, MÜNZEL, HORNIG, JUST, BRUNNER & ZELIS, 1992).

Dentre as alterações na musculatura esquelética supracitadas, mudanças características da síndrome são: diminuição na porcentagem de fibras oxidativas em relação às glicolíticas; diminuição da atividade de enzimas oxidativas, do número e do volume de mitocôndrias; atrofia; apoptose; diminuição da capacidade de geração de força; menor resistência à fadiga; acidose precoce; acúmulo excessivo de lactato; e depleção mais rápida de fosfatos de alta energia (STAINSBY, SUMNERS & EITZMAN, 1985; VESCOVO, ZENNARO, SANDRI, CARRARO, LEPROTTI, CECONI, AMBROSIO & DALLA LIBERA, 1998).

Descondicionamento físico, alterações nutricionais (discutidas posteriormente) e má absorção intestinal são responsáveis em parte por estas alterações (FRANSSEN, WOUTERS & SCHOLS, 2002). Apesar de parte dos trabalhos na literatura mostrar que o fluxo sangüíneo para a musculatura esquelética está reduzido na insuficiência cardíaca (WILSON, MARTIN, SCHWARTZ & FERRARO, 1984; SULLIVAN, KIGHT, HIGGINBOTHAM & COBB, 1989), parte das investigações não verificou essa diminuição (WILSON, FINK, MARIS, FERRARO, POWER-VANWART, ELEFF & CHANCE 1985; WIENER, FINK, MARIS, JONES, CHANCE & WILSON, 1986; MANCINI, FERRARO, TUCHLER, CHANCE & WILSON, 1988; MANCINI, COYLE, COGGAN, BELTZ, FERRARO, MONTAIN & WILSON, 1989; MASSIE, CONWAY, YONGE, FROSTICK, LEDINGHAM, SLEIGHT, RADDA & RAJAGOPALAN, 1987).

Além do possível prejuízo no fluxo sangüíneo muscular, do descondicionamento físico, das alterações nutricionais e da má absorção intestinal, a hiperatividade simpática é vista também como responsável pelos danos morfo-funcionais da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca e contribui nesse quadro fisiopatológico (NEGRÃO, BRANDÃO RONDON, TINUCCI, ALVES, ROVEDA, BRAGA, REIS NASTARI, BARRETTO, KRIEGER & MIDDLEKAUFF, 2001).

Por fim, o incremento na concentração de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também pode contribuir para os danos morfo-funcionais característicos do tecido contrátil esquelético na insuficiência

cardíaca (TSUTSUI, IDE, HAYASHIDANI, SUEMATSU, SHIOMI, WEN, NAKAMURA, ICHIKAWA, UTSUMI & TAKESHITA, 2001).

É importante salientar que essa diminuição na produção de força muscular dos pacientes com insuficiência cardíaca descrita acima persiste mesmo quando as forças são normalizadas pela massa muscular úmida e/ou pela área de secção transversa do músculo (PERREAULT, GONZALEZ-SERRATOS, LITWIN, SUN, FRANZINI-ARMSTRONG & MORGAN, 1993). Além disso, as anormalidades supracitadas, como atrofia, mudança do tipo de fibra e menor prevalência do metabolismo aeróbio, não explicam completamente o padrão de fadiga muscular dos pacientes, que devido à sua velocidade e gravidade, parece refletir prejuízo no acoplamento excitação-contração (MASSIE, SIMONINI, SAHGAL, WELLS & DUDLEY, 1996; BULLER, JONES & POOLE-WILSON, 1991; MINOTTI, PILLAY, CHANG, WELLS & MASSIE, 1992), que está diretamente relacionado ao íon Ca^{2+} . Além disso, um estudo em fibras isoladas de biópsia do músculo vasto lateral de pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos controle mostrou que a função das proteínas contráteis (miosina e actina) não é prejudicada na doença (OKADA, TOTH & VANBUREN, 2008), reforçando a importância da regulação do transporte intracelular de Ca^{2+} .

2.3 Proteínas relacionadas ao transporte de Ca^{2+} e à degradação protéica decorrente de alterações no transporte de Ca^{2+} na musculatura esquelética

A relação do Ca^{2+} com a contração muscular é bem antiga. Já em 1882 RINGER (1882) descobriu que o coração de rã contraía quando era incubado em solução preparada com água de torneira de Londres, mas não quando preparada com água destilada - isso porque a água da torneira continha Ca^{2+} , mas a água destilada não. Este achado possibilitou a descoberta de que a habilidade dos músculos de contrair depende da presença desse cátion na solução externa. Atualmente, segundo BERCHTOLD, BRINKMEIER & MÜNTENER (2000), sabe-se que o Ca^{2+} não está envolvido apenas na excitação e na contração muscular, mas também no relaxamento, na regulação do metabolismo energético e na manutenção

da integridade estrutural da fibra muscular. Além disso, concentrações elevadas de Ca^{2+} citoplasmático podem causar ativação de certas proteases, lipases e nucleases, o que pode ter como conseqüências alterações nas propriedades fisiológicas, no desenvolvimento, na transcrição gênica e na transformação das fibras musculares, além de necrose, apoptose e degradação protéica. Por fim, todas as fibras musculares usam o Ca^{2+} como principal molécula regulatória em resposta a uma série de estímulos, como fatores de crescimento, fatores de diferenciação celular, hormônios, sinais nervosos, exercício físico e lesões (BERCHTOLD et al., 2000).

Por fim, segundo ALBERTS, ROBERTS, LEWIS, RAFF, WALTER & JOHNSON (2004), o Ca^{2+} regula certos canais catiônicos da membrana sarcoplasmática, age como segundo mensageiro e participa da liberação de neurotransmissores. Por isso, várias propriedades das fibras musculares são dependentes da expressão de proteínas envolvidas no transporte e na sinalização do Ca^{2+} , e tal expressão encontra-se alterada em doenças que têm disfunções na musculatura esquelética como característica.

Após Perreault e colaboradores encontrarem prejuízo no transiente de Ca^{2+} na insuficiência cardíaca na musculatura esquelética em 1993 (PERREAULT et al., 1993), começou a ser estudada a expressão das proteínas que transportam esse íon em diferentes etiologias e níveis de gravidade de insuficiência cardíaca, porém os estudos ainda são escassos. O trabalho supracitado foi o primeiro a relatar redução na magnitude e na velocidade da captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático após a contração em associação com redução na tensão e na força tetânica no músculo extensor longo dos dedos de ratos com insuficiência cardíaca, e o primeiro estudo a reportar que a expressão gênica da isoforma de sarco endo-retículo Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 2 estava reduzida no músculo sóleo de ratos infartados com insuficiência cardíaca foi publicado em 1999 (SIMONINI, CHANG, YUE, LONG & MASSIE, 1999). Contrário a esses achados, LUNDE, DAHLSTEDT, BRUTON, LÄNNERGREN, THORÉN, SEJERSTED & WESTERBLAD (2001) não encontraram diferenças na expressão de isoformas de SERCA, de receptor para rianodina (RYR - esse nome é devido à sua alta afinidade pela planta alcalóide chamada rianodina) e de diferentes subunidades do trocador Na^+ - Ca^{2+} (NCX), utilizando os músculos sóleo e flexor curto dos dedos de ratos controle e ratos com insuficiência cardíaca induzida

por ligadura da artéria coronária esquerda. Os resultados controversos do efeito da insuficiência cardíaca na expressão de proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} podem ser explicados por diferenças na gravidade e nas etiologias da insuficiência cardíaca, nas espécies animais estudadas, nos músculos utilizados e/ou nos métodos de análise.

Além do Ca^{2+} estar diretamente envolvido no mecanismo de excitação-contração-relaxamento, alterações de suas concentrações podem estimular processos deletérios à musculatura esquelética, como atrofia, apoptose e diminuição da capacidade regenerativa (BARTOLI & RICHARD, 2005). Por fim, vale ressaltar que em relação a essa atrofia relacionada ao Ca^{2+} , a principal família de proteases envolvidas são as calpaínas, que têm a proteína calpastatina como inibidor endógeno de sua atividade. Apesar de não haver estudos sobre o assunto, essa proteólise dependente de Ca^{2+} pode ter um papel fundamental na atrofia muscular esquelética apendicular na insuficiência cardíaca, na medida em que sua função é clivar uma série de proteínas que, posteriormente, são conduzidas ao sistema proteolítico dependente de ATP para serem degradadas a aminoácidos, o chamado complexo ubiquitina-proteassoma (BARTOLI & RICHARD, 2005).

2.4 Treinamento físico na insuficiência cardíaca

Até o presente momento discutimos a importância da musculatura esquelética no prognóstico da doença e quais são seus acometimentos característicos, tanto em nível funcional e estrutural, como em nível molecular. Naturalmente, uma questão que se apresenta é como tratar tais disfunções musculares. De forma ampla, o tratamento desta doença multifatorial é subdividido em farmacológico e não-farmacológico. O primeiro é compreendido pelas drogas, já relatadas nessa revisão bibliográfica. O tratamento não-farmacológico, por sua vez, nos remete à reabilitação cardíaca.

Reabilitação cardíaca consiste em exercícios físicos, suporte psicossocial e educação com o propósito de facilitar a readaptação do indivíduo portador de doença cardíaca a uma vida normal, por meio de incrementos em sua capacidade funcional máxima e de reduções de seus fatores de risco para novos eventos cardiovasculares. Os programas e as recomendações da Organização

Mundial da Saúde, existentes desde 1964, expandiram o desenvolvimento da reabilitação cardíaca e naquele tempo os primeiros estudos clínicos foram publicados. A reabilitação cardíaca surgiu com programas de exercícios físicos baseados em caminhadas progressivas após infarto do miocárdio e em 1980 tornou uma terapia padronizada nos pacientes internados em hospitais, contrário ao que ocorria antes da década de 1980, quando o tratamento para todos os estágios da insuficiência cardíaca aconselhava o repouso como a primeira linha de defesa destinada a reduzir o estresse sobre o sistema cardiovascular comprometido. Após pouco tempo, testes com exercícios físicos passaram a ser utilizados nesses pacientes e a reabilitação cardíaca tornou parte da vida deles fora do hospital. Metanálises têm demonstrado que a reabilitação cardíaca reduz morte total e por causa cardiovascular em cerca de 20 a 25% e morte súbita em cerca de 37% durante um ano após o infarto agudo do miocárdio (VELASCO RAMI & MAROTO MONTEIRO, 1995; PASHKOW, 1993).

Está bem estabelecido que o treinamento físico melhora a função muscular em indivíduos normais. Na insuficiência cardíaca também há fortes indícios de tal melhora, na medida em que estudos mostram melhora na vasodilatação mediada pelo endotélio, na circulação periférica e coronariana, e no metabolismo do músculo esquelético (NEGRÃO & MIDDLEKAUFF, 2008; ADAMOPOULOS, COATS, BRUNOTTE, ARNOLDA, MEYER, THOMPSON, DUNN, STRATTON, KEMP & RADDA, 1993; HORNIG, MAIER & DREXLER, 1996; WANG, KNECHT, CAI, POPOSKIS, PACKER & BURKHOFF, 1997). O treinamento físico também pode reverter muitas das características da miopatia esquelética da insuficiência cardíaca, como mudança no tipo de fibra muscular, atrofia, apoptose e vasoconstrição (CLARK, POOLE-WILSON & COATS, 1996). Em sua revisão de literatura, WITHAM et al. (2003) mostram ainda melhora na capacidade de realização de atividade física, diminuição dos sintomas e na atividade dos mecanorreceptores, redução da atividade nervosa simpática concomitantemente ao aumento da parassimpática, decréscimo na expressão de citocinas pró-inflamatórias e, na musculatura esquelética, aumento na capacidade de geração de força, na área de secção transversa da fibra, na tolerância à fadiga, no número de mitocôndrias, no número de

capilares por fibra e na atividade de inúmeras enzimas importantes ao metabolismo (WITHAM et al., 2003).

Em relação à expressão de proteínas que transportam Ca^{2+} na musculatura esquelética, há apenas trabalhos que usam um modelo de sobrecarga funcional, no qual um músculo do animal é retirado para aumentar o trabalho dos remanescentes. Ainda assim, os resultados são controversos: KANDARIAN, PETERS, TAYLOR & WILLIAMS (1994) mostraram que houve no músculo plantar aumento na expressão de SERCA 2 e diminuição na recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e na expressão de SERCA 1 e SERCA total. Já SPANGENBURG, LEES, OTIS, MUSCH, TALMADGE & WILLIAMS (2002), usando o mesmo músculo e o mesmo modelo de sobrecarga muscular funcional, mostraram que a expressão de SERCA 1 se manteve igual após essa sobrecarga nesses dois grupos. Assim como os resultados controversos em relação ao efeito da insuficiência cardíaca em proteínas que transportam Ca^{2+} , os resultados controversos sobre o efeito do treinamento físico podem ser explicados por diferenças nos níveis de gravidade e nas etiologias da síndrome, nas espécies animais estudadas, nos músculos utilizados e/ou nos métodos de análise. Além disso, diferentes tipos de treinamento físico podem gerar diferentes adaptações.

2.5 Modelo de insuficiência cardíaca

Tendo em mente todos esses conceitos discutidos até aqui, uma etapa subsequente foi determinar a amostra a ser utilizada. O modelo de insuficiência cardíaca que foi utilizado nessa investigação científica consiste em camundongos com deleção dos genes para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos, que apresentam hiperatividade simpática e 50% de mortalidade aos sete meses de idade (BRUM, KOSEK, PATTERSON, BERNSTEIN & KOBILKA, 2002). Em camundongos controle, ou seja, que não apresentam essa inativação gênica, esses receptores, quando ativados, inibem a atividade nervosa simpática. Como os animais com a inativação não apresentam essa inibição, neles há uma liberação excessiva de noradrenalina nas fendas sinápticas, que cronicamente é tóxica ao organismo (HEIN, 1999).

A vantagem desses animais em relação a outros modelos é devido ao fato de que neles a síndrome se desenvolve gradualmente, mimetizando mais o que

acontece com humanos e possibilitando o estudo da doença em diferentes graus de progressão. Em um modelo de infarto por meio de ligadura da artéria coronária, por exemplo, o dano ao tecido cardíaco ocorre de forma abrupta, ou seja, no instante da cirurgia (BRUM et al., 2002).

Esses camundongos apresentam menor capacidade aeróbia, disfunção contrátil cardíaca com redução na fração de ejeção e taquicardia basal (ROLIM, MEDEIROS, ROSA, MATTOS, IRIGOYEN, KRIEGER, KRIEGER, NEGRÃO & BRUM, 2007). Além das alterações funcionais cardíacas, o sistema nervoso simpático modifica a ultra-estrutura cardíaca desses camundongos a partir dos quatro meses de idade, quando eles passam a apresentar degradação de miócitos cardíacos e hipertrofia dos remanescentes, sugerindo assim um possível remodelamento cardíaco (BRUM et al., 2002). Além disso, foi observado que a hipertrofia dos cardiomiócitos é acompanhada de aumento na fração de colágeno cardíaco, que há alterações na expressão de proteínas envolvidas no transporte de Ca^{2+} no músculo cardíaco (e no próprio transiente de Ca^{2+}), e que tais alterações são diferentes em diferentes estágios de desenvolvimento da síndrome (ROLIM et al., 2007; MEDEIROS, ROLIM, OLIVEIRA, ROSA, MATTOS, CASARINI, IRIGOYEN, KRIEGER, KRIEGER, NEGRÃO & BRUM, 2008).

Também foi demonstrado que diferentes tipos de treinamento físico aeróbico (esteira rolante e natação) e diferentes gerações de antagonistas β -adrenérgicos (metoprolol e carvedilol) apresentam benefícios cardíacos nesse modelo de insuficiência cardíaca, apesar de alguns desses benefícios serem específicos a cada terapia (ROLIM et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008; BARTHOLOMEU, VANZELLI, ROLIM, FERREIRA, BECHARA, TANAKA, ROSA, ALVES, MEDEIROS, MATTOS, COELHO, IRIGOYEN, KRIEGER, KRIEGER, NEGRÃO, RAMIRES, GUATIMOSIM & BRUM, 2008; MEDEIROS, VANZELLI, ROSA, IRIGOYEN & BRUM, 2008).

É importante ressaltar também que todas as etiologias de insuficiência cardíaca em humanos apresentam como característica comum a hiperatividade simpática (BRUM et al., 2002). Por fim, esses animais com inativação gênica dos receptores para os genes α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos apresentam atrofia muscular avaliada por meio da área de secção transversa das fibras musculares e rarefação

capilar, e o treinamento físico aeróbico em esteira rolante reverteu esses prejuízos (BACURAU, JARDIM, FERREIRA, BECHARA, BUENO JÚNIOR, ALBA-LOUREIRO, NEGRÃO, CASARINI, CURI, RAMIRES, MORISCOT & BRUM, 2009). Portanto, a presente investigação científica mostra-se exeqüível no que diz respeito à conformidade dos poucos achados da literatura com o modelo experimental de insuficiência cardíaca que será utilizado na presente dissertação.

Até o momento discutimos alguns aspectos históricos relacionados à insuficiência cardíaca e como aspectos nutricionais e relacionados ao transporte intracelular de Ca^{2+} podem interferir no funcionamento e na estrutura da musculatura esquelética, um tecido de fundamental importância no quadro clínico e no prognóstico da doença. Também vimos que alterações no transporte intracelular de Ca^{2+} podem ativar uma via proteolítica, as calpaínas. Por fim, apresentamos o treinamento físico como terapia potencial para agir nessas variáveis e caracterizamos o modelo da doença que foi utilizado na presente investigação científica.

Com base na literatura, nossa hipótese de trabalho era que o modelo de insuficiência cardíaca utilizado na presente investigação científica apresentava prejuízos funcionais e morfológicos na musculatura esquelética, além de alteração no perfil molecular de expressão das proteínas responsáveis pelo transporte intracelular de Ca^{2+} , com conseqüente ativação das calpaínas, a via proteolítica ativada por este íon. Por fim, acreditávamos que o treinamento físico aeróbico preveniria esses danos do tecido contrátil apendicular, tanto em nível funcional e estrutural, como em nível molecular.

3 JUSTIFICATIVA

A justificativa dessa investigação científica baseia-se na relevância da insuficiência cardíaca como um problema de saúde pública e na falta de conhecimento na literatura sobre o objeto de estudo. Um dado que é representativo da magnitude de importância da insuficiência em nossa nação é que ela é a terceira causa de internação geral no Brasil e a primeira em pessoas com mais de 65 anos de idade, sendo responsável por grande montante dos gastos com saúde no país (ARAUJO, TAVARES, VERÍSSIMO, FERRAZ & MESQUITA, 2005).

Em relação à literatura, são escassos os estudos que buscam caracterizar na insuficiência cardíaca a expressão das proteínas envolvidas no transporte de Ca^{2+} na musculatura esquelética. Além disso, não há estudos que buscam relacionar possíveis alterações nesse transporte de Ca^{2+} com proteínas que disparam processos deletérios de atrofia, morte celular programada e deterioração na capacidade regenerativa, que assim como um prejuízo no próprio transporte de Ca^{2+} , podem ajudar a explicar a intolerância aos esforços físicos da síndrome (BARTOLI & RICHARD, 2005).

Em relação ao treinamento físico, apesar de serem conhecidos inúmeros de seus benefícios na insuficiência cardíaca (WITHAM et al., 2003), não há trabalhos que investigaram seu efeito nas proteínas responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} e pelos processos deletérios descritos acima decorrentes de alterações no transporte desse íon. Além disso, como foi supracitado, grande parte dos trabalhos que estudaram as proteínas que regulam o fluxo intracelular de Ca^{2+} na musculatura esquelética de modelos experimentais de insuficiência cardíaca utilizou expressão gênica. No presente trabalho foi utilizada a expressão protéica, que apresenta algumas vantagens, pois alterações na expressão gênica podem não corresponder às modificações na expressão protéica na medida em que a meia-vida e a atividade do RNAm podem variar de um grupo estudado para outro (SHYU, WILKINSON & VAN-HOOF, 2008).

Vale ressaltar também que dois tipos diferentes de musculatura esquelética foram estudados: o sóleo, mais oxidativo e de contração mais lenta, e o plantar, mais glicolítico e de contração mais rápida. Nesse sentido, com esse trabalho pudemos avaliar se esse tipo de treinamento físico seria capaz de exercer seus efeitos nos diferentes tipos de fibras musculares. Por fim, uma aplicação futura desse estudo pode ser a realização de terapia gênica com o propósito de alterar a expressão das proteínas aqui estudadas.

De forma resumida, os resultados desse estudo ajudarão a elucidar alguns dos mecanismos moleculares responsáveis pela intolerância aos esforços físicos na insuficiência cardíaca no que diz respeito ao Ca^{2+} na musculatura esquelética apendicular. Também serão evidenciados os efeitos do treinamento físico aeróbico nessas variáveis.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito da insuficiência cardíaca e do treinamento físico aeróbico em animais com insuficiência cardíaca em relação à função da musculatura esquelética, à expressão de proteínas que transportam Ca^{2+} no sóleo e no plantar, e à atividade da via proteolítica dependente deste íon nestes músculos.

4.2 Objetivos específicos:

1. Verificar se os animais que teoricamente têm insuficiência cardíaca apresentam os sinais característicos da doença;

2. Verificar se os animais do modelo experimental utilizado no estudo demonstram prejuízos funcionais e morfológicos na musculatura esquelética apendicular;

3. Quantificar o efeito (ou demonstrar a ausência de efeito) da insuficiência cardíaca e do treinamento físico, tanto em camundongos com insuficiência cardíaca como controles, em relação à:

- Função da musculatura esquelética apendicular;
- Expressão nos músculos sóleo e plantar das seguintes proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} e na degradação protéica dependente desse íon:
 - Sarco endo-retículo Ca^{2+} ATPase (SERCA 1);
 - Sarco endo-retículo Ca^{2+} ATPase (SERCA 2);
 - Subunidade $\alpha 1$ do receptor para diidropiridina (DHPR $\alpha 1$);
 - Subunidade $\alpha 2$ do receptor para diidropiridina (DHPR $\alpha 2$);
 - Subunidade $\beta 1$ do receptor para diidropiridina (DHPR $\beta 1$);
 - Trocador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX);
 - Parvalbumina;
 - Receptor para rianodina (RYR);
 - Subunidade S2 das calpaínas;
 - Calpastatina;
- Atividade das calpaínas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostra

Para a realização desse estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, controle (CO) ou com inativação gênica para os receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos, que desenvolvem insuficiência cardíaca (IC). Os animais foram divididos entre os grupos aleatoriamente e foram mantidos em biotério com temperatura controlada entre 22 e 25°C e ciclo claro-escuro (12 horas) invertido. Água e comida foram administradas *ad libitum*. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo em 28 de setembro de 2007, mediante o número 2007/28.

Os animais foram identificados com um dispositivo introduzido subcutaneamente no dorso, após anestesia com éter. Cada dispositivo continha um código com letras e números, o qual foi identificado por meio de leitor automático.

Para confirmação do genótipo foi extraído DNA genômico por meio de biopsia realizada na orelha esquerda dos camundongos. A genotipagem foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR-*polymerase chain reaction*) por meio de termociclador, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção de genes α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos intactos ou inativados.

Quatro grupos de animais (controle - CO, insuficiência cardíaca - IC, controle com treinamento físico - COTF, e insuficiência cardíaca com treinamento físico - ICTF) foram acompanhados dos 5 aos 7 meses de idade, quando eles foram submetidos aos métodos descritos em 5.2, 5.4, 5.6 e 5.7. Os grupos COTF e ICTF foram submetidos ao protocolo de treinamento físico (item 5.3) dos 5 aos 7 meses de idade. Esta idade foi escolhida porque em estudo prévio (como será demonstrado abaixo) vimos que aos 7 meses de idade os animais com insuficiência cardíaca apresentaram os sinais clínicos da síndrome, além de 50% de mortalidade.

5.2 Testes de funcionalidade da musculatura esquelética apendicular

Para a análise da função muscular esquelética foram utilizados dois testes comportamentais (deambulação e resistência à inclinação) que estimam a força contrátil e a coordenação motora (KENNEL, FONTENEAU, MARTIN, SCHMIDT, AZZOUZ, BORG, GUENET, SCHMALBRUCH, WARTER & POINDON, 1996). Além disso, os animais foram submetidos a dois testes de tensão gerada pela pata mediante estímulo elétrico no nervo ciático (força isotônica máxima e força tetânica).

Os dois testes comportamentais foram padronizados baseando-se em KENNEL et al. (1996):

- Teste de deambulação (FIGURA 1): as patas traseiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica e em seguida eles foram posicionados dentro de uma caixa retangular de madeira (sem teto e forrada com papel branco) para caminharem. Posteriormente, o comprimento das passadas foi medido;

Figura 1 - Teste de deambulação.

- Teste de resistência à inclinação (FIGURA 2): os animais foram colocados sobre uma prancheta de madeira, que foi inclinada manualmente em velocidade aproximada de 5° por segundo, com auxílio de cronômetro e transferidor. Anotou-se o ângulo no qual os animais escorregaram da prancheta.

Figura 2 - Teste de resistência à inclinação.

A metodologia empregada para análise da força isotônica máxima e tetânica *in vivo* está descrita em outros estudos (CELICHOWSKI & GROTTTEL, 1992; GROTTTEL & CELICHOWSKI, 1999). Resumidamente, após anestesia com pentobarbital sódico (80mg/kg, i.p.), o nervo ciático direito foi exposto por acesso cirúrgico na região lateral da coxa, após excisão total da pele, incisão na fáscia e divulsionamento da musculatura adjacente. Eletrodos bipolares de prata (0.1mm de diâmetro) foram diretamente conectados ao nervo para eletroestimulação pulsátil utilizando para tal o equipamento *MultiStim System D330 (Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, Hertfordshire, Reino Unido)* - os vasos foram preservados de modo a manter a circulação sangüínea. Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre um suporte de acrílico, tendo o joelho direito fixado a 60° por meio de um pino metálico cuidadosamente colocado sob o tendão do quadríceps, sendo o tendão calcâneo conectado a um transdutor de força por meio de um fio rígido de aço com um gancho em uma das extremidades e o tornozelo fixado a 90° .

Mediante eletroestimulação no nervo ciático os músculos posteriores da perna contraem, gerando uma flexão-plantar, sendo o abalo muscular captado por um transdutor de força (*Grass Technologies, West Warwick, RI, EUA*), que converte o sinal mecânico em sinal elétrico, o qual é condicionado em um pré-amplificador condicionador (*Gould Transducer Signal Conditioner Model 13-6615-50, Gould Instrument Systems, Inc., Valley View, OH, EUA*). Um conversor analógico-digital (*conversor A/D Lynx AC 116, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil*) captura este sinal a uma frequência de amostragem de 100Hz com auxílio do programa *AqDados* (*Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil*), sendo o sinal posteriormente analisado por meio dos programas *AqAnalysis* (*Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil*) e *Microcal Origin* versão 5.0 (*Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA*).

A força isotônica máxima foi obtida regulando o grau de estiramento muscular e a voltagem. Foram utilizados pulsos retangulares de 0,1ms de duração e 1Hz de frequência. Na análise foi considerado o valor médio de 10 picos de tensão, que foi corrigido pelo valor de voltagem utilizado.

Já para a força tetânica foram utilizados pulsos retangulares de 0,5ms de duração e 100Hz de frequência. Na análise foi considerada a maior amplitude do abalo decorrente da somação dos estímulos, sendo a força tetânica expressa como a área sob a curva da contração tetânica corrigida pela voltagem empregada.

5.3 Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico foi realizado em esteira rolante durante 8 semanas, 5 dias por semana. A velocidade da corrida e a duração da sessão de exercício foram aumentadas progressivamente até 60% da velocidade máxima e 60 minutos, parâmetros que foram atingidos na quarta semana no protocolo e mantidos até o final (FERREIRA, ROLIM, BARTHOLOMEU, GOBATTO, KOKUBUN & BRUM, 2007). Segundo este trabalho, esta velocidade corresponde à máxima fase estável do lactato, ou seja, a maior velocidade na qual as concentrações deste metabólito se mantêm constantes ao longo de um exercício físico com intensidade mantida fixa.

A velocidade máxima de treinamento foi obtida por um teste escalonado também realizado em esteira rolante. A velocidade inicial da esteira foi de 6m/min

(sem inclinação). A cada 3 minutos a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de 3 m/min e o teste deu-se por encerrado concomitante à exaustão do animal (FERREIRA et al., 2007). Esse teste também foi utilizado aos 7 meses de idade em todos os animais com o objetivo de avaliar a tolerância ao esforço físico aeróbico.

Figura 3 - Treinamento físico em esteira rolante.

5.4 Coleta de tecidos

Os animais foram mortos por deslocamento cervical, um método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br). Em seguida, o sangue foi coletado e fez-se a dissecação dos pulmões e dos músculos sóleo (músculo de contração lenta), plantar (músculo de contração rápida) e gastrocnêmio (músculo com porção de contração lenta e porção de contração rápida). Todos esses tecidos tiveram suas massas imediatamente aferidas e, na seqüência, os músculos foram congelados em nitrogênio líquido para análises ulteriores. Já os pulmões foram mantidos em estufa a 37° por 48 horas, tendo então sua massa aferida novamente para determinação da razão massa úmida/massa seca, com o objetivo de se avaliar uma eventual presença de edema pulmonar, um sinal clínico importante da insuficiência cardíaca.

5.5 Análise histológica

Com o objetivo de preservar a integridade do tecido, para a análise histológica os músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio foram dissecados em conjunto e mantidos em isopentano imerso em nitrogênio líquido por 10 segundos antes de serem congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, secções transversas dos músculos congelados de 10µm cada foram cortadas em criostato (*Criostat Mícron HM505E, Walldorf, Alemanha*) e incubadas com reagentes que favorecem a atividade da ATPase miofibrilar após pré-incubação em meio alcalino (pH 10.3) ou ácido (pH 4.6), como previamente descrito por BROOKE & KAISER (1970). A reação da miosina ATPase é utilizada para identificar os tipos de fibras musculares, pois as fibras mais oxidativas apresentam maior atividade após pré-incubação ácida e as fibras mais glicolíticas após pré-incubação alcalina. Na seqüência, a área do músculo plantar inteiro foi analisada em aumento de 100x. Por fim, as imagens foram analisadas no programa *Image Pro-plus (Media Cybernetic, Silver Spring, MD, EUA)*.

5.6 Análise da expressão protéica

Os músculos sóleo e plantar dos animais foram homogeneizados com homogeneizador *Polytron (PT-K Brinkman Instruments)* em tampão de lise hipotônico contendo 10mM de *tris-hidroximetil-aminometano* (TRIS) com ácido clorídrico (HCl) e 5mM de EDTA, pH 7.4, na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamidina (20µg/ml), pepstatina (1µg/ml), leupeptina (0.5µg/ml), apoproteína (0.1µg/ml) e PMSF (100µg/ml). O processo de homogeneização durou 5 segundos e na seqüência o homogeneizado foi centrifugado a 12000rpm durante 30 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5ml e a concentração de proteína total das amostras determinada pelo método de BRADFORD (1976).

Neste ensaio as proteínas da amostra são complexadas com o corante azul de *coomassie* brilhante G-250. A reação é colorimétrica e a absorbância é medida a 595nm. Os resultados de absorbância obtidos são lançados na equação da reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina (0 a 0,02mg/ml), repetida a cada determinação enzimática. O resultado foi expresso em mg/ml.

Então as amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (*sodium-dodecyl-sulfate*) e em seguida as proteínas presentes nas amostras separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo TRIS (3,04g para 1L de solução), glicina (14,4g para 1L de solução), metanol (20%) e SDS (10%). As membranas foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com solução tampão *tris buffered saline tween* (TBS-T). Em seguida fez-se o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos por meio de uma mistura contendo TBS-T e leite desnatado (5%) por 60 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana então foi incubada com um anticorpo primário diluído na solução bloqueadora mais azida sódica (0,05%) a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos em solução de TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 1,5 hora em temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos em solução de TBS-T. Por fim, a imuno-deteção foi realizada através do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (*Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-EUA*).

Segue abaixo os anticorpos primários que foram utilizados com as respectivas diluições:

- SERCA 1 (*ABR Incorporation, EUA*): 1:2500;
- SERCA 2 (*ABR Incorporation, EUA*): 1:2500;
- NCX (*ABR Incorporation, EUA*): 1:1000;
- Parvalbumina (*Sigma, EUA*): 1:2000;
- DHPR- α 1 (*ABR Incorporation, EUA*): 1:500;
- DHPR- α 2 (*ABR Incorporation, EUA*): 1:500;
- DHPR- β 1 (*ABR Incorporation, EUA*): 1:1000;
- RYR (*ABR Incorporation, EUA*): 1:500;
- Subunidade S2 da calpaínas (*Triple Point Biologics, EUA*): 1:2000;
- Calpastatina (*Triple Point Biologics, EUA*): 1:2000.

Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos conjugados à peroxidase (*IgG anti-mouse ou anti-rabbit*, ECL, *Amersham Biosciences, EUA*) na titulação de 1:5000 anti os anticorpos primários.

Esclarecemos que todos os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações e em diferentes intervalos de tempo, assim como a solução bloqueadora e as demais etapas metodológicas. A expressão da proteína α -tubulina (*Santa Cruz, EUA*, 1:1000) foi utilizada como normalizadora, pois o nível de sua expressão em estudo piloto foi igual nos diferentes grupos a serem estudados.

5.7 Atividade das calpaínas

A análise da atividade das calpaínas foi medida por meio da técnica de *Western blot* (descrita acima) com os anticorpos para talina e α -fodrina, que são proteínas substratos para as calpaínas. O princípio da técnica é que se a atividade das calpaínas está aumentada, a banda da proteína clivada (menor peso molecular) terá intensidade proporcionalmente maior em relação à soma da banda da proteína íntegra (maior peso molecular) com a banda da proteína clivada (QUINDRY, FRENCH, HAMILTON, LEE, MEHTA & POWERS, 2005; TAKAMURE, MURATA, TAMADA, AZUMA, UENO, 2005; FRENCH, QUINDRY, FALK, STAIB, LEE, WANG & POWERS, 2006; FRENCH, HAMILTON, QUINDRY, LEE, UPCHURCH & POWERS, 2008). A técnica de *Western blot* para esse experimento foi a mesma descrita a priori, com exceção dos anticorpos primários, que nesse caso foram talina (*Sigma, EUA*, 1:500), um substrato específico das calpaínas que liga a actina às proteínas das matriz extracelular, e α -fodrina (*BIOMOL, EUA*, 1:1000), que é clivada tanto pelas calpaínas como pela caspase-3 e têm como função manter a estabilidade da membrana plasmática (QUINDRY et al. 2005).

6 ANÁLISE DOS DADOS

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk* e a homoscedasticidade por meio do teste de *Levene*. Como os dados são independentes, apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, os pressupostos para análises paramétricas foram atingidos.

Portanto, os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média e com o propósito de estudar o efeito da insuficiência cardíaca e do treinamento físico utilizou-se análise de variância (ANOVA) de 2 caminhos (genótipo e treinamento físico como fatores independentes). Esta análise foi executada no programa *Statistica* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), para todas as análises utilizou-se *post-hoc* de *Duncan* quando necessário e adotou-se 5% como nível de significância. Por fim, é importante ressaltar que nas tabelas e figuras não estão representadas as diferenças estatísticas entre os pares CO *versus* ICTF e IC *versus* COTF porque tais comparações não constam dos objetivos do estudo.

7 RESULTADOS

Conforme descrito nos objetivos, o propósito da primeira parte do estudo foi determinar se os animais que teoricamente constituem um modelo experimental de insuficiência cardíaca realmente apresentam os sinais clínicos da doença. A análise destes sinais também já foi realizada por outros estudos do grupo (BRUM et al.; 2007; ROLIM et al., 2007; MEDEIROS et al.; 2008; BARTHOLOMEU et al., 2008; BACURAU et al., 2009). Como pode ser verificado na TABELA 1, os animais com inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos apresentaram prejuízo na função cardíaca, edema pulmonar, maior massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo comprimento corporal, taquicardia de repouso e aumento nas concentrações de noradrenalina, tanto plasmática, como muscular. Portanto, esses animais constituem um modelo experimental de insuficiência cardíaca.

Tabela 1 - Caracterização do modelo experimental de insuficiência cardíaca. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM, com o número de animais entre parênteses. Os grupos foram comparados utilizando-se teste t de *Student*. *: $p < 0.05$.

	CO	IC
Fração de encurtamento cardíaca (%)	22.1 $\pm$ 0.2 (8)	15.5 $\pm$ 0.5 (9)*
Massa úmida/massa seca dos pulmões	5.4 $\pm$ 0.25 (7)	6.58 $\pm$ 0.49 (5)*
Massa do ventrículo esquerdo (g/cm)	0.043 $\pm$ 0.002 (6)	0.054 $\pm$ 0.001 (6)*
Frequência cardíaca de repouso (bpm)	581 $\pm$ 8.4 (16)	690 $\pm$ 7.2 (15)*
Noradrenalina plasmática (pg/ml)	4.99 $\pm$ 0.52 (6)	8.17 $\pm$ 0.8 (6)*
Noradrenalina muscular (pg/g)	0.47 $\pm$ 0.1 (6)	13.14 $\pm$ 3.8 (6)*

A próxima etapa foi determinar se este modelo experimental de insuficiência cardíaca apresenta alterações morfológicas e funcionais da musculatura esquelética apendicular. Como demonstrado na FIGURA 4, os animais com a doença tiveram menor tensão isotônica máxima (painel A), reduzida força tetânica (painel B), menor comprimento das passadas no teste de deambulação (painel C) e menor ângulo de queda no teste de resistência à inclinação (painel D). Além desses danos funcionais, atrofia muscular foi encontrada nesses animais com IC, como observado pela menor área do plantar (FIGURA 4, painel E). Tanto os danos funcionais como os morfológicos podem contribuir para a intolerância ao exercício físico aeróbico, vista no painel F (FIGURA 4).

A **B** **C** **D** **E** **F**

CO

IC

Figura 4 - Caracterização da musculatura esquelética apendicular no modelo experimental de insuficiência cardíaca. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se teste t de *Student*. *: $p<0.05$. Painel A: força isotônica máxima. Painel B: força tetânica. Painel C: teste de deambulação. Painel D: teste de resistência à inclinação. Painel E: área de secção transversa do músculo plantar. Painel F: teste de tolerância ao esforço físico em esteira rolante.

Após confirmarmos a insuficiência cardíaca no modelo experimental e que esses animais apresentam danos morfológicos e funcionais na musculatura esquelética, o próximo passo foi submeter parte dos animais controle e parte dos IC ao treinamento físico aeróbico.

Nesse protocolo, apesar de não haver diferença entre os grupos em relação à massa corporal, os camundongos IC apresentaram maior acúmulo de água nos pulmões do que os animais CO e menores valores do que os animais ICTF (TABELA 2).

Tabela 2 - Massa corporal e edema pulmonar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. #: $p<0.05$ versus CO; \$: $p<0.05$ versus IC.

	CO (n=14)	IC (n=14)	COTF (n=11)	ICTF (n=11)
Massa corporal (g)	28,6 $\pm$ 0,92	26,4 $\pm$ 1,1	27,2 $\pm$ 0,43	25,9 $\pm$ 0,45
Massa úmida/massa seca dos pulmões	5,57 $\pm$ 0,13	6,58 $\pm$ 0,49 [#]	5,78 $\pm$ 0,16	5,82 $\pm$ 0,22 ^{\$}

No teste máximo na esteira rolante, os animais IC mostraram-se intolerantes ao exercício físico em relação aos CO. Os animais ICTF, no entanto, chegaram à exaustão após um tempo maior de teste do que os animais IC (FIGURA 5, painel A). Os resultados dos testes funcionais de deambulação e resistência à inclinação foram similares, ou seja, os animais IC apresentaram resultados inferiores aos CO e aos ICTF (FIGURA 5, painéis B e C).

A

B

C

CO
 IC
 COTF
 ICTF

Figura 5 - Teste de tolerância ao esforço físico em esteira rolante e testes funcionais da musculatura esquelética em animais controle e com insuficiência

cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painel A: teste de tolerância ao esforço físico em esteira rolante. Painel B: teste de deambulação. Painel C: teste de resistência à inclinação.

Na massa úmida dos músculos sóleo e plantar não houve diferença estatística entre os grupos estudados (TABELA 3).

Tabela 3 - Massa dos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias.

	CO (n=6)	IC (n=5)	COTF (n=6)	ICTF (n=5)
Sóleo (g/cm)1000	1,51 $\pm$ 0,04	1,45 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,11	1,44 $\pm$ 0,12
Plantar (g/cm)1000	3,07 $\pm$ 0,04	3,15 $\pm$ 0,32	3,21 $\pm$ 0,39	3,38 $\pm$ 0,33

Em relação à expressão das proteínas responsáveis pela excitação do tecido muscular para a contração, o DHPR $\alpha 1$ nos murinos IC foi menor do que nos CO e nos ICTF (FIGURA 6, painel A) no sóleo - no plantar não houve diferenças importantes entre os grupos (FIGURA 6, painel B). A subunidade $\alpha 2$ do receptor, por sua vez, apresentou-se equivalente entre os grupos no sóleo (FIGURA 6, painel C) e reduzida no plantar dos animais IC em relação aos CO e aos ICTF (FIGURA 6, painel D). Por fim, a subunidade $\beta 1$ estava menos expressa nos IC em relação aos CO, tanto no sóleo (FIGURA 6, painel E) como no plantar (FIGURA 6, painel F), porém

apenas no plantar os resultados do grupo ICTF mostraram-se superiores aos do grupo IC. Neste músculo os animais COTF também apresentaram resultados mais elevados do que o grupo CO.

Figura 6 - Expressão de proteínas relacionadas à excitação para a contração avaliada por *Western blot* nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM, em unidade arbitrária (u. a.). Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painéis A e B: autoradiografias representativas com a proteína normalizadora. Painéis C e D: expressão de DHPR $\alpha 1$. Painéis E e F: expressão de DHPR $\alpha 2$. Painéis G e H: expressão de DHPR $\beta 1$.

O RYR, que libera o Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para a contração, estava diminuído no grupo IC em relação ao CO e aos ICTF no sóleo (FIGURA 7, painel A) e, no plantar, aumentado no grupo ICTF em relação ao grupo IC e no grupo COTF em relação aos CO (FIGURA 7, painel B). Já o NCX que, por exemplo, fornece Ca^{2+} para o citoplasma ao atuar de modo reverso, nos animais IC apresentou-se reduzido em relação aos CO e aos ICTF, em ambos os músculos, sóleo (FIGURA 7, painel C) e plantar (FIGURA 7, painel D). Além disso, a expressão dessa proteína foi maior nos animais COTF do que nos animais CO em ambos os músculos.

Figura 7 - Expressão protéica de RYR e NCX avaliada por *Western blot* nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma

de média $\pm$ EPM, em unidade arbitrária (u. a.). Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painéis A e B: auto-radiografias representativas com a proteína normalizadora. Painéis C e D: expressão de RYR. Painéis E e F: expressão de NCX.

A expressão de SERCA, por sua vez, que recaptura o Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático após a contração, estava diminuída nos animais IC em relação aos CO e aos ICTF, tanto no sóleo (FIGURA 8, painel A), como no plantar (FIGURA 8, painel B) - os valores do grupo COTF também estavam superiores aos do grupo CO em ambos os músculos. Já a expressão de parvalbumina, que transporta o Ca^{2+} até a SERCA 1, foi maior tanto nos camundongos IC como nos COTF em relação aos CO (FIGURA 8, painel C).

Figura 8 - Expressão de proteínas relacionadas à recaptação de Ca^{2+} após a contração avaliada por *Western blot* nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM, em unidade arbitrária

(u. a.). Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painéis A e B: auto-radiografias representativas com a proteína normalizadora. Painéis C e D: expressão de SERCA. Painel E: expressão de parvalbumina.

A calpaína, que promove a clivagem protéica quando ativada por Ca^{2+} , apresentou-se mais expressa nos camundongos IC em relação aos CO no sóleo (FIGURA 9, painel A) e nos IC e COTF no plantar (FIGURA 9, painel B). Já a expressão de calpastatina, o inibidor endógeno da calpaína, foi maior nos animais ICTF em relação aos IC e nos COTF versus CO no sóleo (FIGURA 9, painel C) - no plantar não houve diferença entre os grupos (FIGURA 9, painel D).

Figura 9 - Expressão de proteínas relacionadas à proteólise dependente de Ca^{2+} avaliada por *Western blot* nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM, em unidade arbitrária (u. a.).

Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painéis A e B: auto-radiografias representativas com a proteína normalizadora. Painéis C e D: expressão de calpaína. Painéis E e F: expressão de calpastatina.

Por fim, foi estudada a atividade proteolítica dependente de Ca^{2+} por meio da técnica de *Western blot*. No sóleo, tanto a porcentagem de α -fodrina clivada (FIGURA 10, painel A) como a de talina clivada (FIGURA 10, painel C) estavam reduzidas nos animais ICTF em relação aos IC e nos COTF em relação aos CO. No plantar, não houve diferença estatística entre os grupos analisados (FIGURA 10, painéis B e D).

Figura 10 - Atividade da via proteolítica dependente de Ca^{2+} avaliada por *Western blot* nos músculos sóleo e plantar em animais controle e com insuficiência cardíaca, sedentários e treinados. CO: animais controle. IC: animais com insuficiência cardíaca. COTF: animais controle treinados. ICTF: animais com insuficiência cardíaca treinados. Os dados estão expressos na forma

de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painéis A e B: auto-radiografias representativas. Painéis C e D: porcentagem de α -fodrina clivada. Painéis E e F: porcentagem de talina clivada.

8 DISCUSSÃO

Como descrito acima, os animais com inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos apresentaram sinais clínicos de insuficiência cardíaca, como menor fração de encurtamento cardíaca, hipertrofia miocárdica, edema pulmonar, taquicardia de repouso a aumento das concentrações de noradrenalina, tanto plasmática como muscular. Portanto, esses animais constituem um modelo experimental de insuficiência cardíaca.

Na sequência vimos que os animais desse modelo da doença têm danos funcionais e atrofia muscular, que favorecem a menor tolerância ao exercício físico aeróbico, também demonstrada. Um fator que pode ajudar a explicar essas respostas são os prejuízos nutricionais presentes na doença. De fato, nós vimos em estudo prévio que os animais com insuficiência cardíaca ingerem 14% de ração (dados não mostrados). Com o objetivo de avaliar a importância dessa ingestão alimentar reduzida em relação à função e ao trofismo muscular, desenvolvemos um projeto no qual foi adicionado um terceiro grupo composto por animais controle que ingeriram a mesma quantidade de ração do que os animais com insuficiência cardíaca. Neste estudo foi observado que os animais controle com restrição alimentar, assim como os animais com insuficiência cardíaca, apresentaram menor tensão isotônica máxima (FIGURA 11, painel A), reduzida força tetânica (FIGURA 11, painel B), menor comprimento da passada no teste de deambulação (FIGURA 11, painel C) e reduzido ângulo de queda no teste de resistência à inclinação (FIGURA 11, painel D). Em paralelo, estes animais também apresentaram reduzida área do plantar (FIGURA 11, painel E) e menor tolerância ao exercício físico aeróbico (FIGURA 11, painel F). Portanto, a menor ingestão de ração parece ser um fator

importante para a atrofia muscular e para a disfunção muscular presente na doença, e isso pode ocorrer devido ao menor fornecimento de nutrientes para a geração de energia para a contração e para a síntese protéica, além do déficit de aminoácidos para a síntese protéica. De fato, nós vimos que os animais com insuficiência cardíaca apresentaram níveis plasmáticos reduzidos de glicose e triglicérides (dados não mostrados).

Figura 11 - Caracterização da musculatura esquelética apendicular em animais controle (CO), insuficiência cardíaca (IC) e controle com restrição alimentar (COR). Os dados estão expressos na forma de média $\pm$ EPM. Os grupos foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA)

de uma via com *post-hoc* de *Duncan*. *: $p \leq 0.05$. Painei A: força isotônica máxima. Painei B: força tetânica. Painei C: teste de deambulação. Painei D: teste de resistência à inclinação. Painei E: área de secção transversa do músculo plantar. Painei F: teste de tolerância ao esforço físico em esteira rolante.

Prejuízos na ingesta alimentar acometem uma grande parcela dos pacientes com insuficiência cardíaca. Segundo uma pesquisa, 50% dos pacientes com essa doença apresentam nutrição inadequada (GROSSNIKLAUS, O'BRIEN, CLARK & DUNBAR, 2008). Entre crianças com insuficiência cardíaca, um estudo mostrou que essa proporção é de 57% (BENZECRY, LEITE, OLIVEIRA, MENESES, CARVALHO & SILVA, 2008). Já entre os idosos, um trabalho evidenciou que 64% dos participantes com a síndrome não alcançaram o valor estimado como ideal em relação à ingestão de energia (PRICE, WITHAM & MCMURDO, 2007). Em outra pesquisa, com a mesma faixa etária, a média de ingestão diária dos indivíduos com a doença cardíaca foi 1511kcal (26,8kcal por kg de massa corporal ideal) contra 2264kcal (373,3kcal por kg de massa corporal ideal) nos indivíduos controle (CATAPANO, PEDONE, NUNZIATA, ZIZZO, PASSANTINO & INCALZI, 2008). Até mesmo modelos experimentais de insuficiência cardíaca apresentam essas alterações nutricionais. Em ratos com a doença gerada por estenose aórtica, por exemplo, a ingestão de ração foi de 32g - no grupo controle esse valor foi de 42g (HÉLIÈS-TOUSSAINT, MOINARD, RASMUSEN, TABBI-ANNENI, CYNOBER & GRYNBERG, 2005).

Dentre as consequências dessa redução na ingestão de alimentos estão os balanços nitrogenado e energético negativos (AQUILANI, OPASICH, VERRI, BOSCHI, FEBO, PASINI & PASTORIS, 2003; PASINI, OPASICH, PASTORIS & AQUILANI, 2004). De acordo com um estudo (AQUILANI et al., 2003), por exemplo, 60 a 70% dos pacientes com insuficiência cardíaca têm balanço nitrogenado negativo.

É importante ressaltar também que até mesmo pacientes com insuficiência cardíaca classificados com sobrepeso ou obesidade de acordo com o

índice de massa corporal podem apresentar características de desnutrição, como hipoalbuminemia (HORWICH, KALANTAR-ZADEH, MACLELLAN & FONAROW, 2008).

A menor ingestão de ração e de água em pacientes com insuficiência cardíaca pode ter relação com: fatores sociais, como o paciente morar sozinho e ter um número reduzido de pessoas para dar assistência na compra e preparo dos alimentos; fatores emocionais, como depressão e solidão; fadiga, dispnéia, náuseas e incômodos respiratórios decorrentes do ato de alimentar; alterações nos centros da fome e da saciedade localizados no hipotálamo; diminuição do apetite decorrente de terapia farmacológica; ascites, prejuízos na motilidade gastro-intestinal e na absorção intestinal devido a edema e redução do fluxo sanguíneo; deterioração na gustação e no olfato; e ativação inflamatória característica da insuficiência cardíaca. Vale salientar que muitos desses processos são agravados pela idade avançada, que é uma característica comum da síndrome (LENNIE et al., 2006; OKA & SANDERS, 2005; LENNIE & STEWARD, 2001). Vários desses fatores podem, potencialmente, também estar presentes nos camundongos com insuficiência cardíaca da presente investigação.

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) também estão envolvidos na inibição da ingestão alimentar na insuficiência cardíaca, pois estas citocinas estão aumentadas nessa doença que apresenta um quadro inflamatório característico (LANGHANS & HRUPKA, 1999). O TNF- α aumenta a expressão do hormônio catabólico leptina, que inibe a ingestão (GRUNFELD, ZHAO, FULLER, POLLACK, MOSER & FRIEDMAN, 1996; KIRCHGESSNER, UYSAL, WIESBROCK, MARINO & HOTAMISLIGIL, 1997), enquanto a IL-1 reduz os níveis de RNAm hipotalâmicos de neuropeptídeo Y (NPY), um estimulante da ingestão alimentar (GAYLE, ILYIN & PLATA-SALAMAN, 1997).

É fundamental também contemplarmos o papel da grelina e do NPY nas respostas de fome e saciedade. No núcleo arqueado do hipotálamo, há receptores estimuladores da liberação de hormônio do crescimento 1a (GHS-1aR) em neurônios que expressam os neuropeptídeos orexígenos relacionados a *agouti* (AgRP) e NPY. A grelina estimula esses GHS-1aR, aumentando a expressão de AgRP e NPY, além de diminuir a expressão de pró-ópio-melanocortina (POMC) - isso

resulta em aumento no comportamento de procura por alimento. Há também GHS-R no núcleo do trato solitário, onde a grelina gera um aumento adicional na ingestão alimentar. Além desses efeitos na ingestão alimentar, a grelina pode ter outros efeitos benéficos na insuficiência cardíaca devido a suas propriedades anti-inflamatórias (diminui a expressão de receptores de citocinas no sistema nervoso central; GHS-R é expresso nos leucócitos e grelina diminui os níveis de interleucina-6 - IL-6) e à sua capacidade de aumentar os níveis de hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que reconhecidamente são anabólicos. Além disso, ela melhora a motilidade gástrica, bloqueia o decréscimo na ingestão alimentar induzido pela leptina e tem efeitos benéficos cardíacos (*in vitro* inibe a apoptose de cardiomiócitos e células endoteliais e a infusão em humanos diminui a resistência vascular periférica e a pressão arterial, além de aumentar a fração de ejeção cardíaca) (DEBOER, 2008).

Em ratos com insuficiência cardíaca, em dois estudos a administração de grelina e agonistas GHS-R por três semanas aumentou a massa corporal e as concentrações de IGF-1, além de melhorar a função cardíaca (NAGAYA, UEMATSU, KOJIMA, IKEDA, YOSHIHARA & SHIMIZU, 2001; XU, PANG, CAO, NI, XU & PENG, 2005). Em outro estudo no qual os animais foram tratados por quatro semanas, apesar de aumentos na massa corporal, na massa magra e na ingestão alimentar, o tratamento não alterou a função cardíaca (AKASHI, PALUS, DATTA, HALEM, TAYLOR, THOENE-REINEKE, DONG, THUM, CULLER, ANKER & SPRINGER, 2008).

Em pacientes portadores da síndrome, o tratamento com grelina também por três semanas aumentou a massa corporal magra, a ingestão alimentar e a função ventricular (NAGAYA, ITOH, MURAKAMI, OYA, UEMATSU, MIYATAKE & KANGAWA, 2005; NAGAYA, MORIYA, YASUMURA, UEMATSU, ONO & SHIMUZU, 2004). No entanto, a questão que ainda não foi estudada é se esses benefícios de manteriam em um tratamento por um longo período de tempo.

Como pode ser observado na FIGURA 11, apenas na área de secção transversa do músculo plantar a redução no grupo controle com restrição alimentar foi maior do que no grupo insuficiência cardíaca, o que pode ser devido à presença de edema intramuscular (CONFER, REAVIS & PANCIERA, 1983).

Em relação à massa corporal dos animais com insuficiência cardíaca e controle, sedentários e treinados, não houve diferença estatística entre os grupos estudados e isso parece razoável na medida em que nos animais com insuficiência cardíaca estudados parece não haver um quadro característico bem estabelecido de caquexia, quando sim há redução da massa corporal (ANKER, CHUA, PONIKOWSKI, HARRINGTON, SWAN, KOX, POOLE-WILSON & COATS 1997). Outro fator que pode favorecer a não redução da massa corporal nos animais com insuficiência cardíaca é a presença de edema corporal, como foi evidenciado nos pulmões. Isso ocorre devido à menor capacidade do coração bombear o sangue na doença - ele vai se acumulando no leito venoso e extravasa para o interstício.

Como foi demonstrado, os animais com insuficiência cardíaca treinados deixaram de apresentar esse edema pulmonar e isso pode refletir a melhora na função já cardíaca já observada em outros estudos (MEDEIROS et al., 2008; ROLIM et al., 2007).

Em relação à função da musculatura esquelética, vários estudos, como BECKERS, DENOLLET, POSSEMIERS, WUYTS, VRINTS & CONRAADS (2008), mostram que mesmo o treinamento aeróbico leva a benefícios funcionais na musculatura esquelética de camundongos com insuficiência cardíaca. Nossos dados corroboraram essa resposta, ou seja, os animais com insuficiência cardíaca treinados apresentaram resultados superiores aos sedentários.

Buscando entender os fatores que contribuem para essa melhora funcional na musculatura esquelética dos animais com insuficiência cardíaca, a primeira variável analisada foi a massa dos músculos sóleo e plantar, que não foi diferente entre os grupos estudados. No entanto, essa medida não é tão sensível para esse objetivo e um estudo do nosso grupo (BACURAU et al., 2009) já havia evidenciado que o mesmo protocolo de treinamento físico aeróbico utilizado no presente trabalho preveniu a atrofia muscular dos camundongos insuficiência cardíaca, não repetimos esse experimento.

O próximo passo foi tentar entender em nível molecular, mecanismos relacionados à melhora na funcionalidade e no trofismo da musculatura esquelética dos camundongos com insuficiência cardíaca. Em relação à expressão das proteínas relacionadas ao transporte intracelular de Ca^{2+} nos músculos sóleo e plantar, os

animais com insuficiência cardíaca apresentaram prejuízo na expressão dessas proteínas, cujas funções serão descritas abaixo.

O DHPR é responsável por transmitir o impulso elétrico de despolarização da membrana plasmática da fibra muscular ao RYR por meio de alterações conformacionais no complexo protéico, mecanismo pelo qual há a liberação da maior quantidade do Ca^{2+} necessário à contração. Sua subunidade $\alpha 1$ é a formadora do poro, pelo qual entra uma pequena quantidade de Ca^{2+} que estimula uma liberação adicional desse íon do RYR. Estudos em cultura celular de miotúbulos mostraram que a subunidade $\alpha 1$ é a mais importante para a transdução do sinal - ela é essencial para o acoplamento excitação-contração na medida em que sua ausência faz com que não haja o transiente de Ca^{2+} ativado por voltagem no miócito esquelético (SHERIDAN, CARBONNEAU, AHERN, NATARAJ & CORONADO, 2003). Essa subunidade apresentou-se reduzida no músculo sóleo dos animais com insuficiência cardíaca, no entanto o treinamento físico aumentou sua expressão nos animais doentes.

Esse mesmo resultado no músculo plantar em relação à subunidade extracelular $\alpha 2$ do DHPR, que fornece os elementos estruturais requeridos para a estimulação do canal, além de ter grande participação na ativação dependente de voltagem e na inativação do complexo (LACINOVÁ, 2005).

Já a subunidade $\beta 1$ do DHPR estava reduzida nos animais com insuficiência cardíaca sedentários em ambos os músculos e nos animais doentes treinados essa redução não foi observada. Essa proteína é expressa na musculatura esquelética, a $\beta 2$ é encontrada em grandes proporções no coração e em menor quantidade na aorta, na traquéia, nos pulmões e no cérebro, enquanto RNAm da subunidade $\beta 3$ é detectado no cérebro e na musculatura lisa - a subunidade $\alpha 1$ da musculatura esquelética é regulada principalmente pela subunidade $\beta 1$. Essa subunidade modula a cinética de ativação e inativação da corrente de Ca^{2+} , além de ser importante para mudanças conformacionais que ocorrem no receptor e para sua atividade de poro (SHERIDAN et al., 2003). Em camundongos sem a subunidade $\beta 1$ não há o acoplamento excitação-contração e os animais morrem no início do desenvolvimento (ARIKKATH, CHEN, AHERN, ALLAMAND, FLANAGAN, CORONADO, GREGG & CAMPBELL, 2003).

O RYR, por sua vez, apesar de estar reduzido nos animais com insuficiência cardíaca apenas no sóleo, teve sua expressão aumentada em ambos os músculos com o treinamento físico. Esse receptor permite a saída do Ca^{2+} para o citossol para que esse cátion se ligue à troponina C, desencadeando a contração muscular (BERCHTOLD et al., 2000).

Em relação às subunidades do DHRR e ao RYR, proteínas que em última instância vão influenciar na quantidade de Ca^{2+} liberado para a contração, vimos que, de forma geral, a insuficiência cardíaca diminui a expressão dessas proteínas, contrário ao achado em relação ao treinamento físico. Portanto, uma redução na expressão dessas proteínas pode resultar em uma menor concentração de Ca^{2+} para a contração e/ou um maior intervalo de tempo de duração deste evento.

Em 1994, LI, MATSUOKA, HRYSHKO, NICOLL, BERSOHN, BURKE, LIFTON & PHILIPSON discutiam que a relativa abundância de NCX na musculatura esquelética era algo surpreendente na medida em que uma função fisiológica para o NCX neste tecido não tinha sido demonstrada. Atualmente, no entanto, há alguns indícios de possíveis funções para essa proteína na musculatura esquelética, como enviar para o meio extracelular o Ca^{2+} que entra na célula, transportar esse cátion para o interior da célula ao atuar de modo reverso em determinadas situações, como fadiga muscular e grande número de contrações sucessivas (HUDECOVA, VADASZOVA, SOUKUP & KRIZANOVA, 2004; ROSSI & DIRKSEN, 2006; PAREKH & PUTNEY JR, 2005), e/ou ter uma função modulatória na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (BERCHTOLD et al., 2000; SACCHETTO, MARGRETH, PELOSI, CARAFOLI, 1996). Essa proteína foi regulada negativamente pela insuficiência cardíaca e positivamente pelo treinamento físico aeróbico tanto no sóleo como no plantar. Portanto, o treinamento em esteira rolante pode resultar, por exemplo, em um aumento na atuação do NCX em modo reverso, de modo a aumentar o Ca^{2+} disponível para a contração.

A SERCA é a principal proteína que atua na recaptção de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático após a contração - a isoforma 2 é a principal em músculos de contração mais lenta, como o sóleo e o diafragma, e a isoforma 1 a mais importante em músculos de contração mais rápida, como o plantar (PETERS, MITCHELL, MCCUNE, PARK, WILLIAMS & KANDARIAN, 1997; BERCHTOLD et al.,

2000). Tanto no sóleo como no plantar, a expressão de SERCA foi reduzida com a doença e aumentada com o treinamento físico. Esses dados sugerem que a recaptção do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático após a contração está prejudicada na insuficiência cardíaca e que o treinamento em esteira rolante previne esta alteração.

Como o Ca^{2+} é de fundamental importância ao processo de excitação-contracção-relaxamento da musculatura, esse desarranjo no perfil molecular da expressão dessas proteínas potencialmente tem como consequência uma menor oferta de Ca^{2+} para a contração e/ou um maior intervalo de tempo desse processo; e uma menor recaptção do íon para o retículo sarcoplasmático após a contração e/ou em maior intervalo de tempo para ocorrer. Isso pode ajudar a explicar, pelo menos em parte, os prejuízos funcionais supracitados.

Apenas a proteína parvalbumina teve sua expressão aumentada no grupo insuficiência cardíaca. Essa proteína é importante principalmente nos músculos de contração mais rápida, como o plantar, nos quais favorece o relaxamento por se ligar ao Ca^{2+} , reduzindo a concentração desse cátion no citossol (WILWERT, MADHOUN & COUGHLIN, 2006; SCHWALLER, DICK, DHOOT, CARROLL, VRBOVA, NICOTERA, PETTE, WYSS, BLUETHMANN, HUNZIKER & CELIO, 1999) após a contração. Nesse sentido, uma hipótese para explicar esse resultado seria uma resposta compensatória do tecido muscular na tentativa de minimizar os efeitos da expressão reduzida de SERCA 1 e o consequente acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma.

Por fim, tentamos entender porque a insuficiência cardíaca leva à redução na expressão das proteínas que transportam Ca^{2+} . Como discutido acima, o fornecimento de energia e aminoácidos para a síntese protéica pode estar prejudicado. De fato, no projeto supracitado, vimos que os animais controle com restrição alimentar apresentaram prejuízos similares aos do grupo insuficiência cardíaca na expressão das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} (dados não mostrados). Além da energia e dos aminoácidos para a síntese protéica, essas proteínas que transportam Ca^{2+} apresentam um dispêndio energético grande quando em funcionamento. Na musculatura esquelética em contração, por exemplo, a energia gasta com o transporte intracelular de Ca^{2+} representa mais de 50% do total

de energia gasta pelas células. Mesmo em repouso, só a SERCA pode consumir até 25% da energia total (SIMONIDES, THELEN, LINDEN, MULLER & HARDEVELD, 2001).

Além disso, nos animais com insuficiência cardíaca as calpaínas podem estar clivando em maior grau essas proteínas que transportam Ca^{2+} , o que é sustentado por um estudo recente que, ao inibir as calpaínas, viu uma menor degradação dessas proteínas (FRENCH et al. 2008). Como descrevemos previamente, observamos uma maior expressão de calpaína nos animais com insuficiência cardíaca. O treinamento físico, por sua vez, pode diminuir a degradação dessas proteínas pelas calpaínas. De fato, vimos no músculo sóleo que um dos efeitos crônicos do exercício físico foi reduzir a atividade do sistema proteolítico depende de Ca^{2+} . No entanto, como demonstramos, no plantar não houve alteração nesse sistema e é conhecido que o treinamento físico pode até aumentar sua atividade - essa regulação está descrita em detalhes abaixo.

Outra possibilidade para explicar a redução na expressão das proteínas que regulam o transporte intracelular de Ca^{2+} nos animais com insuficiência cardíaca são os níveis reduzidos do hormônio tireoidiano T3 característicos da doença.

Um estudo, por exemplo, verificou que 58% dos pacientes com insuficiência cardíaca apresentavam níveis plasmáticos reduzidos de T3, e que tal variável foi um preditor independente de mortalidade na síndrome - apenas 37% dos pacientes com T3 baixo sobreviveram em um ano de seguimento contra 100% daqueles com níveis normais do hormônio (HAMILTON, STEVENSON, LUU & WALDEN, 1990). Há outros estudos que mostram o T3 reduzido em pacientes com insuficiência cardíaca, os promissores resultados da administração exógena do hormônio (HAMILTON, STEVENSON, FONAROW, STEIMLE, GOLDBABER, CHILD, CHOPRA, MORIGUCHI & HAGE, 1998; PINGITORE & IERVASI, 2005; GALLI, PINGITORE & IERVASI, 2008; PINGITORE & IERVASI, 2008), e sua relação com drogas normalmente utilizadas na doença. Uma pesquisa demonstrou, por exemplo, que 76% dos pacientes que tomaram amiodarona apresentaram reduzidos valores de T3 (ASCHEIM & HRYNIEWICZ, 2002).

O T3 modula a expressão das proteínas responsáveis pelo transiente intracelular de Ca^{2+} por meio de elementos responsivos a ele localizados na região promotora dos genes dessas proteínas (SIMONIDES et al., 2001).

Há vários trabalhos que mostram que no coração os níveis de T3 estão diretamente relacionados à expressão das proteínas que transportam o Ca^{2+} intracelular. Há pesquisas demonstrando que a restrição alimentar diminui os níveis de T3 a expressão gênica de RYR2 (VIZOTTO, CARVALHO, SUGIZAKI, LIMA, ARAGON, PADOVANI, CASTRO, PAI-SILVA, NOGUEIRA & CICOGNA, 2007), a atividade do RYR e da SERCA (O'BRIEN, SHEN, BISSONETTE & JEEJEEBHOY, 1995), e a recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (RUPP, MAISCH & BRILLA, 1997). Em outro estudo, o T3 e a expressão de SERCA 2 estavam reduzidos na restrição alimentar, e a administração de T3 exógeno restaurou esses prejuízos (KATZEFF, POWELL & OJAMAA, 1997)

Em cultura de cardiomiócitos humanos, pesquisas evidenciaram que a expressão de SERCA é aumentada por incrementos na concentração de T3 e reduzida pelo acréscimo de noradrenalina e pela diminuição dos níveis de T3 (MULLER, ZUIDWIJK, SIMONIDES & HARDEVELD, 1997; FORINI, PAOLICCHI, PIZZORUSSO, RATTO, SAVIOZZI, VANINIE & IERVASIA, 2001). Por fim, vale registrar que em um estudo no qual T3 exógeno foi administrado em ratos com insuficiência cardíaca, o remodelamento cardíaco foi atenuado, e houve melhora nas variáveis hemodinâmicas e na expressão de SERCA 2 no coração (PANTOS, MOUROUZIS, MARKAKIS, DIMOPOULOS, XINARIS, KOKKINOS, PANAGIOTOU & COKKINOS, 2007).

De maneira oposta, tanto os níveis de RNA mensageiro como os níveis protéicos de SERCA 2a estão elevados em corações hipertireoideus induzidos experimentalmente (ARAI, OTSU, MACLENNAN, ALPERT & PERIASAMY, 1991; CHANG, FIGUEREDO, SCHREUR, KARIYA, WEINER, SIMPSON & CAMACHO, 1997).

Apesar de em menor número, há também estudos relacionando o hormônio tireoidiano à expressão das proteínas relacionadas ao Ca^{2+} na musculatura esquelética. Segundo esses trabalhos, os níveis de T3 são diretamente proporcionais à expressão de SERCA na musculatura esquelética, além de regularem o NCX e o

fosfolambano, uma proteína que modula a atividade da SERCA (SIMONIDES et al., 2001; SIMONIDES, LINDEN & HARDEVELD, 1990; SAYEN, ROHRER & DILLMANN, 1992; LINDEN, SIMONIDES, MULLER, LAARSE, VERMEULEN, ZUIDWIJK, MOORMAN & HARDEVELD, 1996).

Além disso, o exercício físico pode aumentar os níveis de T3, reduzidos na doença, de modo a restaurar a expressão dessas proteínas. De fato, um estudo mostrou que o nível desse hormônio apresenta correlação diretamente proporcional com o consumo de oxigênio máximo em pacientes com insuficiência cardíaca (PANTOS, DRITSAS, MOUROUZIS, DIMOPOULOS, KARATASAKIS, ATHANASSOPOULOS, MAVROGENI, MANGINAS & COKKINOS, 2007).

Outra possibilidade é que por reduzir o estresse oxidativo e a resposta inflamatória característicos da insuficiência cardíaca, o treinamento físico diminuiria a degradação de uma série de proteínas, inclusive às relacionadas ao Ca^{2+} (BARKER & TRABER, 2007). De fato, foi demonstrado que nesse modelo experimental o estresse oxidativo está aumentado e é reduzido pelo treinamento físico aeróbico (BACURAU et al., 2009). É conhecido que o estresse oxidativo aumenta a atividade das calpaínas e, por meio de oxidação e nitrosilação, favorece a degradação proteica por outras vias proteolíticas (BARKER & TRABER, 2007).

A última possibilidade que apresentamos é que por diminuir o nível de atividade nervosa simpática (BACURAU et al., 2009), o treinamento diminui os possíveis efeitos deletérios dessa hiperativação simpática no tecido muscular esquelético, inclusive os efeitos relacionados à expressão dessas proteínas. De fato, nós demonstramos que camundongos com inativação gênica para os receptores β_2 adrenérgicos, a principal forma de atuação do sistema nervoso simpático na musculatura esquelética, apresentam menor área de secção transversa na musculatura esquelética (BACURAU et al., 2009).

Outro efeito do desarranjo na expressão dessas proteínas é a permanência de uma maior contração de Ca^{2+} no citoplasma celular na ausência de contração muscular, que ativa a via proteolítica dependente desse cátion. De fato, vimos que no sóleo e no plantar dos animais com insuficiência cardíaca a expressão de calpaína estava aumentada, sem alteração na calpastatina, o seu inibidor endógeno. Isso sugere uma maior atividade dessa via proteolítica.

O treinamento físico, por sua vez, não preveniu o aumento na expressão de calpaína no sóleo dos animais com insuficiência cardíaca. No entanto, levou a um aumento na expressão de seu inibidor endógeno, a calpastatina. Isso sugere um menor nível de degradação protéica. De fato, a porcentagem de α -fodrina e talina clivada nos animais doentes treinados foi menor do que nos sedentários, corroborando a hipótese supracitada. Há também na literatura um estudo no qual a proporção de talina e α -fodrina clivada no tecido cardíaco foi menor em ratos submetidos à isquemia-reperfusão quando exercitados e quando seus corações foram tratados com inibidores das calpaínas (QUINDRY et al. 2005; FRENCH et al., 2006).

Já no plantar o treinamento físico não preveniu o aumento na expressão de calpaína nos animais com insuficiência cardíaca, não levou a um aumento na expressão de calpastatina, nem alterou a porcentagem de α -fodrina e talina clivadas. O sistema proteolítico dependente de Ca^{2+} pode ser regulado em nível pós-traducional neste músculo, por meio de fosforilação, por exemplo. Por fim, deve ser lembrado que além da α -fodrina e da talina, inúmeras proteínas contráteis, estruturais e relacionadas ao transiente de Ca^{2+} são substratos das calpaínas; e que o exercício físico pode até aumentar a atividade das calpaínas e a translocação delas para áreas hidrofóbicas, como membranas e as linhas Z, onde elas necessitam de uma menor concentração de Ca^{2+} para serem ativadas (ARTHUR, BOOKER & BELCASTRO, 1999). A idéia é que quando há um quadro de atrofia, como na insuficiência cardíaca, a clivagem inicial pelas calpaínas é seguida por clivagem completa até aminoácidos pelo sistema ubiquitina-proteassoma. No entanto, no caso do exercício físico essa clivagem inicial é seguida por reestruturação dos fragmentos protéicos clivados de forma a levar a uma melhora funcional e estrutural do tecido (BARTOLI & RICHARD, 2005).

Por fim, vale ressaltar que em relação à calpaína, foi analisada a expressão protéica da subunidade menor das calpaínas 1 e 2, a chamada S2, que tem importante papel no “enovelamento” dessas proteínas, bem como na localização delas em relação às proteínas acessórias. Também foi estudada a expressão protéica da calpastatina, o inibidor endógeno das calpaínas. A maioria das isoformas

de calpaína participam do processo de atrofia, sendo responsáveis pela degradação inicial do citoesqueleto e desunião das proteínas sarcoméricas, que posteriormente são degradadas em pequenos peptídeos pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Tais proteínas também estão intimamente relacionadas à necrose celular devido a uma entrada descontrolada de Ca^{2+} para o meio citoplasmático. Além disso, provavelmente as calpaínas também estejam relacionadas à apoptose e à diminuição da capacidade regenerativa da musculatura esquelética, sendo que tal capacidade envolve a proliferação, a migração e a fusão das células satélites (BARTOLI & RICHARD, 2005).

9 LIMITAÇÕES

Nós reconhecemos limitações em nosso estudo. Seria plausível, por exemplo, a análise do transiente de Ca^{2+} por meio de microscopia de fluorescência na tentativa de demonstrar que a alteração na expressão protéica resulta em prejuízo no transiente de Ca^{2+} . No entanto, uma série de estudos (BARTHOLOMEU et al., 2008, por exemplo) demonstraram que o nível de expressão protéica é um bom indicativo da dinâmica de deslocamento desse íon, na medida em que corroborou os dados do transiente de Ca^{2+} .

Por fim, também seria razoável medir a força isotônica máxima e a força tetânica nos animais treinados com o objetivo de melhor avaliar a função muscular, pois nos testes com os animais acordados (deambulação e resistência à inclinação) potencialmente uma alteração no nível de motivação e/ou coordenação motora entre os grupos poderia influenciar nos resultados. No entanto, como vimos nos resultados com os animais sedentários, no estudo dos animais controle com restrição alimentar (apresentado na Discussão) e em outros projetos com modelos de distrofia muscular, os resultados dos testes comportamentais apresentam correlação estatística com essas medidas.

10 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados da presente investigação científica sugerem que os camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos apresentam insuficiência cardíaca, disfunção muscular (força isotônica máxima, força tetânica, teste de deambulação, teste de resistência à inclinação), prejuízos nas proteínas relacionadas ao transiente de Ca^{2+} tanto no sóleo como no plantar (DHPR $\alpha 1$, DHPR $\alpha 2$, DHPR $\beta 1$, RYR, NCX, SERCA 1, SERCA 2, parvalbumina), além de alterações na via proteolítica dependente deste íon (calpaína e calpastatina). O treinamento físico aeróbico, por sua vez, preveniu o aparecimento desses danos funcionais e moleculares nos animais com insuficiência cardíaca. Em conclusão, o treinamento físico aeróbico em esteira rolante mostrou-se uma terapia não-farmacológica importante na prevenção dos danos no tecido muscular esquelético apendicular característicos da síndrome.

REFERÊNCIAS

ADAMOPOULOS, S.; COATS, A. J.; BRUNOTTE, F.; ARNOLDA, L.; MEYER, T.; THOMPSON, C. H.; DUNN, J. F.; STRATTON, J.; KEMP, G. J. RADDA, G. K. Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure. **Journal of The American College of Cardiology**, Washington, v. 21, n. 5, p. 1101-1106, 1993.

AKASHI, Y. J.; PALUS, S.; DATTA, R.; HALEM, H. TAYLOR, J. E.; THOENE-REINEKE, C.; DONG, J.; THUM, T.; CULLER, M. D.; ANKER, S. D.; SPRINGER, J. No effects of human ghrelin on cardiac function despite profound effects on body composition in a rat model of heart failure. **International Journal of Cardiology**, Sydney, no prelo, 2008.

ALBERTS, B.; ROBERTS, K.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WALTER, P.; JOHNSON, A. Molecular Biology of the Cell. 4. ed. New York: Garland Publishing, 2004.

ANKER, S. D.; CHUA, T. P.; PONIKOWSKI, P.; HARRINGTON, D.; SWAN, J. W.; KOX, W. J.; POOLE-WILSON, P. A.; COATS, A. J. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. **Circulation**, Dallas, v. 92, n. 2, p. 526-534, 1997.

AQUILANI, R.; OPASICH, C.; VERRI, M.; BOSCHI, F.; FEBBO, O.; PASINI, E.; PASTORIS, O. Is Nutritional Intake Adequate in Chronic Heart Failure Patients? **Journal of The American College of Cardiology**, Washington, v. 42, p. 1218-1223, 2003.

ARAI, M.; OTSU, K.; MACLENNAN, D. H.; ALPERT, N. R.; PERIASAMY, M. Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. **Circulation Research**, Baltimore, v. 69, p. 266-276, 1991.

ARAUJO, D. V.; TAVARES, L. R.; VERÍSSIMO, R.; FERRAZ, M. B.; MESQUITA, E. T. Custo da insuficiência cardíaca no Sistema Único de Saúde. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 422-427, 2005.

ARIKKATH, J.; CHEN, C. C.; AHERN, C.; ALLAMAND, V.; FLANAGAN, J. D.; CORONADO, R.; GREGG, R. G.; CAMPBELL, K. P. $\gamma 1$ subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v. 278, n. 2, p. 1212-1219, 2003

ARTHUR, G. D.; BOOKER, T. S.; BELCASTRO, A. N. Exercise promotes a subcellular redistribution of calcium-stimulated protease activity in striated muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Winnipeg, v. 77, p. 42-47, 1999.

ASCHEIM, D. D.; HRYNIEWICZ, K. Thyroid hormone metabolism in patients with congestive heart failure: the low triiodothyronine state. **Thyroid**, Worcester, v. 12, n. 6, p. 511-515, 2002.

BACURAU, A. V. N.; JARDIM, M. A.; FERREIRA, J. C. B.; BECHARA, L. R. G.; BUENO JÚNIOR, C. R.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; NEGRÃO, C. E.; CASARINI, D. E.; CURI, R.; RAMIRES, P. R.; MORISCOT, A. S.; BRUM, P. C. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, no prelo, 2009.

BARKER, T.; TRABER, M. G. From animals to humans: evidence linking oxidative stress as a causative factor in muscle atrophy. **The Journal of Physiology**, London, v. 583, n. 2, p. 421-422, 2007.

BARTHOLOMEU, J. B.; VANZELLI, A. S.; ROLIM, N. P.; FERREIRA, J. C.; BECHARA, L. R.; TANAKA, L. Y. ; ROSA, K. T.; ALVES, M. M.; MEDEIROS, A.; MATTOS, K. C.; COELHO, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRÃO, C. E.; RAMIRES, P. R.; GUATIMOSIM, S.; BRUM, P. C. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Saint Louis, v. 45, n. 2, p. 240-249, 2008.

BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Saint Louis, v. 37, p. 2115-2133, 2005.

BECKERS, P. J.; DENOLLET, J.; POSSEMIERS, N. M.; WUYTS, F. L.; VRINTS, C. J.; CONRAADS, V. M. Combined endurance-resistance training vs. endurance training in patients with chronic heart failure: a prospective randomized study. **European Heart Journal**, Oxford, v. 29, n. 15, p. 1858-1866; 2008.

BENZECRY, S. G.; LEITE, H. P.; OLIVEIRA, F. C.; MENESES, J. F. S.; CARVALHO, W. B.; SILVA, C. M. Interdisciplinary approach improves nutritional status of children with heart diseases. **Nutrition**, Syracuse, v. 24, p. 669-674, 2008.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 80, p. 1215-1265, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, London, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROOKE M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Archives of Neurology**, New York, v. 23, p. 369-379, 1970.

BRUM, P. C.; KOSEK, J.; PATTERSON, A. BERNSTEIN, D.; KOBILKA, B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 283, p. 1838-1845, 2002.

BULLER, N. P.; JONES, D. A.; POOLE-WILSON, P. A. Direct measurement of skeletal muscle fatigue in patients with chronic heart failure. **British Heart Journal**, London, v. 65, p. 20-24, 1991.

CATAPANO, G.; PEDONE, C.; NUNZIATA, E.; ZIZZO, A.; PASSANTINO, A.; INCALZI, R. A. Nutrient intake and serum cytokine pattern in elderly people with heart failure. **European Journal of Heart Failure**, Oxford, v. 10, p. 428-434, 2008.

CELICHOSKI, J.; GROTTTEL, K. The dependence of twitch course of medial gastrocnemius and its motor units on stretching of the muscle. **The Italian Archives of Biology**, Venezia, v. 130, p. 315-325, 1992.

CHANG, K. C.; FIGUEREDO, V. M.; SCHREUR, J. H.; KARIYA, K.; WEINER, M. W.; SIMPSON, P. C.; CAMACHO, S. A. Thyroid hormone improves function and Ca^{2+} handling in pressure overload hypertrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 100, p. 1742-1749, 1997.

CLARK, A. L.; POOLE-WILSON, P. A.; COATS, A. J. Exercise limitation in chronic heart failure: central role of the periphery. **Journal of The American College of Cardiology**, Washington, v. 28, n. 5, p. 1092-1102, 1996.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from the International Forum on cardiac remodeling. **Journal of The American College of Cardiology**, Washington, v. 35, p. 569-582, 2000.

COLUCCI, W. S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. **Clinical Cardiology**, Hoboken, v. 21, p. 120-124, 1998.

CONFER, A. W.; REAVIS, D. U.; PANCIERA, R. J. Light and electron microscopic changes in cardiac and skeletal muscle of sheep with experimental monensin toxicosis. **Veterinary Pathology**, Cambridge, v. 20, n. 5, p. 590-602, 1983.

DAVIS, R. C.; HOBBS, F. D. R.; LIP, G. Y. H. ABC of heart failure: history and epidemiology. **British Medical Journal**, Kansas, v. 320, p. 39-42, 2000.

DAYER, M. J.; HOPKINSON, N. S.; ROSS, E. T.; JONVILLE, S.; SHARSHAR, T.; KEARNEY, M.; MOXHAM, J.; POLKEY, M. I. Does symptom-limited cycle exercise cause low frequency diaphragm fatigue in patients with heart failure? **European Journal of Heart Failure**, Saint Louis, v. 8, n. 1, p. 68-73, 2006.

DEBOER, M. D. Emergence of ghrelin as a treatment for cachexia syndromes. **Nutrition**, Syracuse, v. 24, p. 806-814, 2008.

DREXLER, H.; HAYOZ, D.; MÜNZEL, T.; HORNIG, B.; JUST, H.; BRUNNER, H. R.; ZELIS, R. Endothelial function in chronic congestive heart failure. **The American Journal of Cardiology**, Dallas, v. 69, p. 1596-1601, 1992.

FERRARI, R.; CECONI, C. Neuroendocrine activation in left ventricular dysfunction. **European Heart Journal**, Oxford, v. 19, p. 1423-1424, 1998.

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATO, C. A.; KOKUBUM, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Melbourne, n. 34 v. 8, p. 760-765, 2007.

FORINI, F.; PAOLICCHI, A.; PIZZORUSSO, T.; RATO, G. M.; SAVIOZZI, M.; VANINIE, V.; IERVASIA, G. 3,5,3'-triiodothyronine deprivation affects phenotype and intracellular $[Ca^{2+}]_i$ of human cardiomyocytes in culture. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 51, p. 322-330, 2001.

FRANCIOSA, J. A.; PARK, M.; LEVINE, T. B. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. **The American Journal of Cardiology**, Dallas, v. 47, p. 33-39, 1981.

FRANSSEN, F. M. E.; WOUTERS, E. F. M.; SCHOLS, A. M. W. J. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. **Clinical Nutrition**, London, v. 21, p. 1-14, 2002.

FRENCH, J. P.; HAMILTON, K. L.; QUINDRY, J. C.; LEE, Y.; UPCHURCH, P. A.; POWERS, S. K. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. **The FASEB Journal**, New York, v. 22, n. 8, 2862-2871, 2008

FRENCH, J. P.; QUINDRY, J. C.; FALK, D. J.; STAIB, J. L.; LEE, Y.; WANG, K. K.; POWERS, S. K. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 290, n. 1, p. 128-136, 2006.

GALLI, E.; PINGITORE, A.; IERVASI, G. The role of thyroid hormone in the pathophysiology of heart failure: clinical evidence. **Heart Failure Reviews**, Detroit, no prelo, 2008.

GAYLE, D.; ILYIN, S. E.; PLATA-SALAMAN, C. R. Central nervous system IL-1 β system and neuropeptide Y mRNAs during IL-1 β -induced anorexia in rats. **Brain Research Bulletin**, Cardiff, v. 44, p. 311-317, 1997.

GROSSNIKLAUS, D. A.; O'BRIEN, M. C.; CLARK, P. C.; DUNBAR, S. B. Nutrient intake in heart failure patients. **The Journal of Cardiovascular Nursing**, Pennsylvania, v. 23, n. 4, p. 357-363, 2008.

GROTTEL, K.; CELICHOSKI, J. The influence of changes in the stimulation pattern on force and fusion in motor units of the rat medial gastrocnemius muscle. **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 127, p. 298-306, 1999.

GRUNFELD, C.; ZHAO, C.; FULLER, J.; POLLACK, A.; MOSER, A.; FRIEDMAN J. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 97, p. 2152-2157, 1996.

HAMILTON, MA; STEVENSON, LW; FONAROW, GC; STEIMLE, A; GOLDHABER, JI; CHILD, JS; CHOPRA, IJ; MORIGUCHI, JD; HAGE, A. Safety and hemodynamic effects of intravenous triiodothyronine in advanced congestive heart failure. **American Journal of Cardiology**, Saint Louis, n. 81, v. 4, p. 443-447, 1998.

HAMILTON, M. A.; STEVENSON, L. W.; LUU, M.; WALDEN, J. A. Altered thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. **Journal of The American College of Cardiology**, Washington, v. 16, n. 1, p. 91-95, 1990.

HEIN, L. Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature**, Boston, v. 11, n. 402, p. 181-184, 1999.

HÉLIÈS-TOUSSAINT, C.; MOINARD, C.; RASMUSEN, C.; TABBI-ANNENI, I.; CYNOBER, L.; GRYNBERG, A. Aortic banding in rat as a model to investigate malnutrition associated to heart failure. **American Journal of Physiol - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, p. R1325-R1331, 2005.

HORNIG, B; MAIER, V.; DREXLER, H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 93, n. 2, p. 210-214, 1996.

HORWICH, T. B.; KALANTAR-ZADEH, K.; MACLELLAN, R. W.; FONAROW, G. C. Albumin levels predict survival in patients with systolic heart failure. **American Heart Journal**, New York, v. 155, p. 883-889, 2008.

HUDECOVA, S.; VADASZOVA, A.; SOUKUP, T.; KRIZANOVA, O. Effect of thyroid hormones on the gene expression of calcium transport systems in rat muscles. **Life Sciences**, Stockholm, v. 75, n. 8, 923-931, 2004.

JONDEAU, G.; KATZ, S. D.; ZOHMAN, L.; GOLDBERGER, M.; MCCARTHY, M.; BOURDARIAS, J. P.; LEJEMTEL, T. H. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 86, n. 5, p. 1351-1356, 1992.

KANDARIAN, S. C.; PETERS, D. G.; TAYLOR, J. A. WILLIAMS, J. H. Skeletal muscle overload upregulates the sarcoplasmic reticulum slow calcium pump gene. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v. 266, n. 5, p. C1190-C1197, 1994.

KATZEFF, H. L.; POWELL, S. R.; OJAMAA, K. Alterations in cardiac contractility and gene expression during low-T3 syndrome: prevention with T3. **American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism**, Bethesda, v. 273, p. E951-E956, 1997.

KENNEL P. F.; FONTENEAU, P.; MARTIN, E.; SCHMIDT, J. M.; AZZOUZ, M.; BORG, J.; GUENET, J. L.; SCHMALBRUCH, H.; WARTER, J. M.; POINDON, P. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. **Neurobiology of Disease**, London, v. 3, p. 137-147, 1996.

KIRCHGESSNER, T. G.; UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; MARINO, M. W.; HOTAMISLIGIL, G. S. Tumor necrosis factor- α contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, n. 100, p. 2777-2782, 1997.

LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. Tese de doutorado, Bratislava: Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 2005.

LANGHANS, W.; HRUPKA, B. Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake. **Neuropeptides**, Bethesda, v. 33, p. 415-24, 1999.

LENNIE, T. A.; STEWARD, D. K. Energy regulation in inflammation-induced anorexia: implications for treatment. **Nutrition**, Syracuse, n. 17, p. 740-741, 2001.

LENNIE, T. A.; MOSER, D. K.; HEO, S.; CHUNG, M. L.; ZAMBROSKI, C. H. Factors influencing food intake in patients with heart failure. **The Journal of Cardiovascular Nursing**, Pennsylvania, v. 21, n. 2, p. 123-129, 2006.

LI, Z.; MATSUOKA, S.; HRYSHKO, L. V.; NICOLL, D. A.; BERSOHN, M. M.; BURKE, E. P.; LIFTON, R. P.; PHILIPSON, K. D. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. **The Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v. 269, n. 26, p. 17434-17439, 1994.

LINDEN, C. G. V. D.; SIMONIDES, W. S.; MULLER, A.; LAARSE, W. J. V. D.; VERMEULEN, J. L.; ZUIDWIJK, M. J.; MOORMAN, A. F.; HARDEVELD, C. V. Fiber-specific regulation of Ca(2+)-ATPase isoform expression by thyroid hormone in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 271, p. 1908-1919, 1996.

LU, L.; MEI, D. F.; GU, A. G.; WANG, S.; LENTZNER, B.; GUTSTEIN, D. E.; ZWAS, D.; HOMMA, S.; YI, G. H.; WANG, J. Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 92, p. 1524-1530, 2002.

LUNDE, P. K.; DAHLSTEDT, A. J.; BRUTON, J. D.; LÄNNERGREN, J.; THORÉN, P.; SEJERSTED, O. M.; WESTERBLAD, H. Contraction and intracellular Ca²⁺ handling in isolated skeletal muscle of rats with congestive heart failure. **Circulation Research**, Baltimore, v. 88, n. 12, p. 1299-1305, 2001.

LUNDE, P. K.; SJAASTAD, I.; SCHIOTZ THORUD, H. M.; SEJERSTED, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 171, p. 277-294, 2001.

MANCINI, D. M.; COYLE, E.; COGGAN, A.; BELTZ, J.; FERRARO, N.; MONTAIN, S.; WILSON, J. R. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 80, p. 1338-1346, 1989.

MANCINI, D. M.; FERRARO, N.; TUCHLER, M.; CHANCE, B.; WILSON, J. R. Detection of abnormal calf muscle metabolism in patients with heart failure using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **The American Journal of Cardiology**, Dallas, v. 62, p. 1234-1240, 1988.

MARKS, A. R. A guide for the perplexed. towards in understanding of the molecular basis of heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 107, p. 1456-1459, 2003.

MASSIE, B.; CONWAY, M.; YONGE, R.; FROSTICK, S.; LEDINGHAM, J.; SLEIGHT, P.; RADDA, G.; RAJAGOPALAN, B. Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure: relation to clinical severity and blood flow. **Circulation**, Dallas, v. 76, p. 1009-1019, 1987.

MASSIE, B. M.; SIMONINI, A.; SAHGAL, P.; WELLS, L.; DUDLEY, G. A. Relationship of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in patients with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, Washington, v. 27, p. 140-146, 1996.

MEDEIROS, A.; ROLIM, N. P.; OLIVEIRA, R. S.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; CASARINI, D. E.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 104, n. 1, p. 103-109, 2008.

MEDEIROS, A.; VANZELLI, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C., BRUM, P. C. Effect of exercise training and carvedilol treatment on cardiac function and structure in mice with sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 9, p. 812-817, 2008.

MINOTTI, J. R.; CHRISTOPH, I.; OKA, R.; WEINER, M. W.; WELLS, L.; MASSIE, B. M. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure: relationship to systemic exercise performance. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 88, n. 6, p. 2077-2082, 1991.

MINOTTI, J. R.; PILLAY, P.; CHANG, L.; WELLS, L.; MASSIE, B. M. Neurophysiological assessment of in patients with congestive heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 86, p. 903-908, 1992.

MULLER, A.; ZUIDWIJK, M. J.; SIMONIDES, W. S.; HARDEVELD, C. V. Modulation of SERCA2 expression by thyroid hormone and norepinephrine in cardiocytes: role of contractility. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 272, p. 1876-85, 1997.

NAGAYA, N.; ITOH, T.; MURAKAMI, S.; OYA, H.; UEMATSU, M.; MIYATAKE, K.; KANGAWA, K. Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD. **Chest**, Northbrook, v. 128, p. 1187-1193, 2005.

NAGAYA, N.; MORIYA, J.; YASUMURA, Y.; UEMATSU, M.; ONO, F.; SHIMUZU, W. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 110, p. 3674-3679, 2004.

NAGAYA, N.; UEMATSU, M.; KOJIMA, M.; IKEDA, Y.; YOSHIHARA, F.; SHIMIZU, W. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 104, p. 1430-1435, 2001.

NEGRÃO, C. E.; BRANDÃO RONDON, M. U. P.; TINUCCI, T.; ALVES, M. J. N.; ROVEDA, F.; BRAGA, A. N. W.; REIS, S. F.; NASTARI, L.; BARRETTO, A. C. P.; KRIEGER, E. M.; MIDDLEKAUFF, H. R. Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 280, p. H1286-H1292, 2001.

NEGRÃO, C. E.; MIDDLEKAUFF, H. R. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 104, n. 3, p. 577-578, 2008.

O'BRIEN, P. J.; SHEN, H.; BISSONETTE, D.; JEEJEEBHOY, K. N. Effects of hypocaloric feeding and refeeding on myocardial Ca and ATP cycling in the rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Winnipeg, v. 142, p. 151-161, 1995.

OKA, R. K.; SANDERS, M. G. The impact of exercise on body composition and nutritional intake in patients with heart failure. **Progress in Cardiovascular Nursing**, Darien, v. 20, p. 148-154, 2005.

OKADA, Y.; TOTH, M. J.; VANBUREN, P. Skeletal muscle contractile protein function is preserved in human heart failure. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 104, p. 952-957, 2008.

PANTOS, C.; DRITSAS, A.; MOUROUZIS, I.; DIMOPOULOS, A.; KARATASAKIS, G.; ATHANASSOPOULOS, G.; MAVROGENI, S.; MANGINAS, A.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. **European Journal of Endocrinology**, Berlin, v. 157, n. 4, p. 515-520, 2007.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MARKAKIS, K.; DIMOPOULOS, A.; XINARIS, C.; KOKKINOS, A. D.; PANAGIOTOU, M.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, Martigny, v. 32, p. 333-339, 2007.

PAREKH, A. B. & PUTNEY JR, J. W. Store-operated calcium channels. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 85, p. 757-810, 2005.

PASHKOW, F. J. Issues in contemporary cardiac rehabilitation: a historical perspective. **Journal of The American College of Cardiology**, Washington v. 1, n. 21(3), p. 822-834, 1993.

PASINI, E.; OPASICH, C.; PASTORIS, O.; AQUILANI, R. Inadequate nutritional intake for daily life activity of clinically stable patients with chronic heart failure. **American Journal of Cardiology**, Saint Louis, v. 93, p. 41-43, 2004.

PERREAULT, C. L.; GONZALEZ-SERRATOS, H.; LITWIN, S. E.; SUN, X.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.; MORGAN, J. P. Alterations in contractility and intracellular Ca^{2+} transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. **Circulation Research**, Baltimore, v. 73, p. 405-412, 1993.

PETERS, D. G.; MITCHELL, H. L.; MCCUNE, S. A.; PARK, S.; WILLIAMS, J. H.; KANDARIAN, S. C. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression in congestive heart failure. **Circulation Research**, Baltimore, v. 81, n. 5, p. 703-710, 1997.

PINGITORE, A.; IERVASI, G. Thyroid function and heart failure: from the new clinical evidences to the potential therapeutical implications. **Recenti Progressi in Medicina**, Roma, v. 96, n. 11, p. 535-541, 2005.

PINGITORE, A.; IERVASI, G. Triiodothyronine (T3) effects on cardiovascular system in patients with heart failure. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, Sharjah, v. 3, n. 1, p. 19-27, 2008.

PRATA, P. R. Uneven development and the inequality of mortality in Brazil. Tese de mestrado, Leeds: Department of Public Health Medicine, Leeds University, 1989.

PRICE, R. J. G.; WITHAM, M. D.; MCMURDO, M. E. T. Defining the nutritional status and dietary intake of older heart failure patients. **European Journal of Cardiovascular Nursing**, Sophia Antipolis, n. 6, p. 178-183, 2007.

QUINDRY, J.; FRENCH, J.; HAMILTON, K.; LEE, Y.; MEHTA, J. L.; POWERS, S. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. **Experimental Gerontology**, Saint Louis, v. 40, n. 5, p. 416-425, 2005.

RINGER, S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. **The Journal of Physiology**, London, v. 3, p. 380-383, 1882.

ROLIM, N. P.; MEDEIROS, A.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 29, n. 3, p. 246-252, 2007.

ROSSI, A. E.; DIRKSEN, R. T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle & Nerve**, Hoboken, v. 33, n. 6, p. 715-731, 2006.

SACCHETTO, R.; MARGRETH, A.; PELOSI, M.; CARAFOLI, E. Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 237, p. 483-488, 1996.

SAYEN, M. R.; ROHRER, D. K.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone response of slow and fast sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase mRNA in striated muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, London, v. 87, p. 87-93, 1992.

SCHWALLER, B.; DICK, J.; DHOOT, G.; CARROLL, S.; VRBOVA, G.; NICOTERA, P.; PETTE, D.; WYSS, A.; BLUETHMANN, H.; HUNZIKER, W.; CELIO, MR. Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin in knockout mice. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 276, n. 2, C395-C403, 1999.

SHERIDAN, D. C.; CARBONNEAU, L.; AHERN, C. A.; NATARAJ, P.; CORONADO, R. Ca²⁺-dependent excitation-contraction coupling triggered by the heterologous cardiac/brain DHPR β 2a-subunit in skeletal myotubes. **Biophysical Journal**, Virginia, v. 85, n. 6, p. 3739-3757, 2003.

SHYU, A. B.; WILKINSON, M. F.; VAN HOOFF, A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 27, n. 3, p. 471-481, 2008.

SIMONIDES, W. S., LINDEN, G. C. V. D.; HARDEVELD, C. V. Thyroid hormone differentially affects mRNA levels of Ca-ATPase isozymes of sarcoplasmic reticulum in fast and slow skeletal muscle. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 274, p. 73-76, 1990.

SIMONIDES, W. S.; THELEN, M. H.; LINDEN, C. G. V. D.; MULLER, A.; HARDEVELD, C. V. Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. **Bioscience Reports**, London, v. 21, n. 2, p. 139-154, 2001.

SIMONINI, A.; CHANG, K.; YUE, P.; LONG, C. S.; MASSIE, B. M. Expression of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase is reduced in rats with postinfarction heart failure. **Heart**, London, v. 81, p. 303-307, 1999.

SPANGENBURG, E. E.; LEES, S. J.; OTIS, J. S.; MUSCH, T. I.; TALMADGE, R. J.; WILLIAMS, J. H. Effects of moderate heart failure and functional overload on rats plantaris muscle. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 92, p. 18-24, 2002.

STAINSBY, W. N.; SUMNERS, C.; EITZMAN, P. D. Effects of catecholamines on lactic acid output during progressive working contractions. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 6, p. 1809-1814, 1985.

SULLIVAN, M. J.; KIGHT, J. D.; HIGGINBOTHAM, M. B.; COBB, F. R. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 80, p. 769-781, 1989.

TAKAMURE, M.; MURATA, K. Y.; TAMADA, Y.; AZUMA, M.; UENO, S. Calpain-dependent alpha-fodrin cleavage at the sarcolemma in muscle diseases. **Muscle & Nerve**, Hoboken, v. 32, n. 3, p. 303-309, 2005.

TSUTSUI, H.; IDE, T.; HAYASHIDANI, S.; SUEMATSU, N.; SHIOMI, T.; WEN, J.; NAKAMURA, K.; ICHIKAWA, K.; UTSUMI, H.; TAKESHITA, A. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 104, p. 134-136, 2001.

VELASCO RAMI, J. A.; MAROTO MONTERO, J. M. Cardiac rehabilitation - its historical evolution and current situation. **Revista Española de Cardiología**, Madrid, v. 48, n. 1, p. 1-7, 1995.

VESCOVO, G.; ZENNARO, R.; SANDRI, M.; CARRARO, U.; LEPROTTI, C.; CECONI, C.; AMBROSIO, G. B.; DALLA LIBERA, L. Apoptosis of skeletal muscle myofibers and interstitial cells in experimental heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Saint Louis, v. 30, p. 2449-2459, 1998.

VIZOTTO, V. A.; CARVALHO, R. F.; SUGIZAKI, M. M.; LIMA, A. P.; ARAGON, F. F.; PADOVANI, C. R.; CASTRO, A. V. B.; PAI-SILVA, M. D.; NOGUEIRA, C. R.;

VOLTERRANI, M.; CLARK, A. L.; LUDMAN, P. F.; SWAN, J. W.; ADAMAPOULOS, S.; PIEPOLI, M.; COATS, A. J. Predictors of exercise capacity in chronic heart failure. **European Heart Journal**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 801-809, 1994.

WANG, J.; YI, G. H.; KNECHT, M.; CAI, B. L.; POPOSKIS, S.; PACKER, M.; BURKHOF, D. Physical training alters the pathogenesis of pacing-induced heart failure through endothelium-mediated mechanisms in awake dogs. **Circulation**, Dallas, v. 96, n. 8, p. 2683-2692, 1997.

WIENER, D. H.; FINK, L. I.; MARIS, J.; JONES, R. A.; CHANCE, B.; WILSON, J. R. Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in heart failure: role of reduced muscle blood flow. **Circulation**, Dallas, v. 73, p. 1127-1136, 1986.

WILSON, J. R. Exercise intolerance in heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 91, p. 559-561, 1995.

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

WILSON, J. R.; MARTIN, J. L.; SCHWARTZ, D.; FERRARO, N.. Exercise intolerance in patients with chronic heart failure: role of impaired nutritive flow to skeletal muscle. **Circulation**, Dallas, v. 69, p. 1079-1087, 1984.

WILSON, J. R.; RAYOS, G.; YEOH, T. K.; GOTHARD, P.; BAK, K. Dissociation between exertional symptoms and circulatory function in patients with heart failure. **Circulation**, Dallas, v. 92, n. 1, p. 47-53, 1995.

WILWERT, J. L.; MADHOUN, N. M.; COUGHLIN, D. J. Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheepshead and kingfish. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, 227-237, 2006.

WITHAM, M. D.; STRUTHERS, A. D.; MCMURDO, M. E. Exercise training as a therapy for chronic heart failure: can older people benefit? **Journal of The American Geriatrics Society**, Los Angeles, v. 51, p. 699-709, 2003.

XU, X. B.; PANG, J. J.; CAO, J. M.; NI, C.; XU, R. K.; PENG, X. Z. GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 289, p. 1643-1651, 2005.

Anexo 1 - Dados individuais.

Ângulo de queda (°)

CO	IC	COTF	ICTF
68,3	64,3	65,4	66,2
71,1	68,8	69,8	69,7
68,8	64,0	72,3	69,5
64,6	61,7	55,8	75,4
68,3	63,5	69,3	73,3
64,9	67,4	64,1	69,9
69,8	66,1	68,0	74,2
68,3	67,8	67,2	62,1
66,8	64,3	69,3	62,1
70,4	66,7	75,5	65,6
67,9	62,3	72,3	63,4
69,9	63,4	68,9	66,6
67,2		71,5	67,0

Ângulo de queda (°)

CO	IC	COR
69,0	64,0	60,7
73,0	63,3	60,7
67,7	62,0	69,0
62,3	62,7	58,0
76,0	65,3	67,7
67,0	70,0	60,7
67,7	72,3	63,3
68,3	66,3	66,7
69,7	66,3	65,0
75,7	69,7	69,0
68,7	60,7	60,0
73,0	62,0	64,3
63,0	63,7	
68,4		
70,2		
69,4		

Área plantar (mm²)

CO	IC	COR
1,19	1,00	0,84
1,14	0,93	0,79
1,10	0,99	0,93
0,98	0,97	0,85
0,98	1,06	0,93
1,07	0,97	0,85
1,07		0,79
1,00		

Calpaína plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
3912	5126	5452	5883
4288	5103	5271	6925
3410	5242	6731	4757
4572	5574	5422	4634
	4959		

Calpaína sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
10675	11397	11867	11910
10175	10990	10047	7883
5045	12090	12294	12397
9702	12024	9188	13374
4698	12247	9922	9707
11006	11528	9037	9451
8547		9829	8324
7986		10394	12621
10114		9143	10482
10969			

Calpastatina plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
3876	3041	3684	2584
3062	3542	2798	2976
2507	3534	3302	3785
3671	3802	3580	3194
2413	1625	3056	3422
3176	3389	3111	2891
3725	3511	3308	2079
3435	3090	3049	3678
2706	3464	1980	2833
3174	3518	3343	3413
	3441	3159	3188

Comprimento da passada (cm)

CO	IC	COR
	7,1	6,7
	6,8	6,5
	6,7	4,9
	6,2	5,2
	7,0	5,3
	7,1	6,9
	7,4	5,8
	6,6	6,5
	7,6	7,8
		5,7
		5,9

Calpastatina sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
5821	3416	9256	7972
3286	6495	5524	5752
5881	3831	6980	6224
4754	5248	6385	6739
4498	4985	5504	7301
4163	5917	5769	7309
		6137	6101

DHPR α 1 plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
5376	3599	3928	5015
4896	4708	4214	5941
5360	4329	6208	6913
4121	4368	5332	3626
5297			

Comprimento da passada (cm)

CO	IC	COTF	ICTF
6,7	6,9	7,4	6,7
7,2	5,8	5,8	7,1
6,4	6,2	6,5	7,0
6,9	6,3	5,2	6,5
7,3	6,8	7,5	7,2
7,4	6,6	7,4	7,8
6,3	6,9	6,9	6,8
6,9	6,3	7,0	7,1
7,1	6,7	7,0	6,0
6,5	7,2	7,3	5,9
7,1	5,5	6,9	7,3
6,7	5,9	7,4	6,9
7,2		6,8	6,4

DHPR α 1 sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
8558	2868	5858	8817
8184	2294	6234	6045
9356	3483	3743	7295
7941	3084	8444	5304
5555	6554	6246	6456
5439	4147	9302	9267
			8629
			6599

DHPR $\alpha 2$ plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
5039	3599	6950	5015
5376	3847	5362	5941
4896	4708	5744	8112
5360	4329	8490	6913
4121	2672	4775	8470
5538	4368	6208	3626
5240	3311	5332	5001
5796	4406	6740	8761
5297	2772		5761
	5561		6182
			3796
			5663
			7396
			6287
			4409
			3370
			5844

DHPR $\alpha 2$ sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
7998	5821	9335	8827
9265	10868	10721	8968
10226	9120	13597	10892
10247	7493	12537	8565
8826	11013	8739	9643
9704	11177	9326	13497
10018	9251	12008	10310
8813			12941
			7886
			13279
			8993
			9352

DHPR $\beta 1$ plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
5894	3515	11406	6193
5700	2270	12745	6416
7285	5083	6837	7220
6966	7763	6078	7905
8291	4023	8650	6894
6570	5187	11383	8947
7253		5678	10763
6291			8614
7600			7343
7265			9051
			8472
			8447

DHPR $\beta 1$ sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
13113	3020	8625	10139
8244	4697	12302	7972
9042	4876	9350	7997
12341	10897	10119	10354
13574	9035	9435	12704
10705	6889	8574	8064
11797	10126	11040	8187
9815	10276		12209
9093	8505		8268
8922			8598
9211			

Força isotônica máxima (mN/V)

CO	IC	COR
214	73	30
278	24	11
84	49	139
86	234	27
193	21	150
197	43	

Força tetânica [(mN.ms)/V]

CO	IC	COR	
	537	88	15
	190	149	137
	134	25	233
	324	6	84
		100	

NCX plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
3551	1651	5687	8040
4842	3700	8311	7362
5495	2967	4405	5377
4009	2307	4479	6059
5667	3395	5518	7181
4740	4447	6493	4965
3794	5261	5489	6248
3740	4318	7791	7097
5321	4146	4595	5909
5444		6537	4693
			5221
			6390
			7111
			5175

NCX sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
11693	8095	12425	9737
9628	8566	11457	9130
11699	8049	12998	10360
9778	7225	9725	12609
9060	7206	13395	10802
11074	10592	13674	13479
14813	10749	13555	8939
9356	8897	11549	13051
9333			13085
9635			10023
8476			12771
			8649
			8994

Parvalbumina plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
7327	12648	18003	11162
7417	10543	5903	10892
4182	16519	17826	11106
7148	14619	6022	14433
8113	11013	5765	12852
5831	19851	14451	11155
8163	11475	5913	13967
5917	12973		14090
	19727		12555
			11288
			14226
			14413

RZR plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
10343	7481	7757	16110
6348	7623	9164	15508
9116	10409	12272	9730
6333	6754	8310	14643
5799	9468	13369	10322
4599	4668	11482	9869
10361	5261	11915	11592
	11444		10552

RZR sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
8173	3752	10697	6442
6383	5509	9186	7509
6705	2729	8319	7362
9263	7834	10777	10670
	7118		7089
	2406		16056

SERCA 1 plantar (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
6337	7660	8428	8306
6878	4600	6291	8519
6170	4925	6672	6873
6858	4236	8144	9433
6443	7625	8072	6934
7363	4314	9534	9882
6964	4800		9031
6463	4003		8336
6876			6346
			9744
			7196
			6653

SERCA 2 sóleo (u. a.)

CO	IC	COTF	ICTF
8409	5165	9880	7655
9025	6731	9672	10691
7740	6419	12341	6982
11136	4794	8915	10496
10248	6088	9987	9576
7275	6517	9673	7153
7510	5617	9002	6023
6607	8256		6784
	8378		9458
	6935		10348
			7945
			6168
			9954
			6741
			7010

Tempo até exaustão (min)

CO	IC	COTF	ICTF
22,5	11,2	25,5	25,3
17,2	18,4	31,4	22,4
14,0	11,3	29,3	22,3
18,4	13,8	28,0	26,0
17,0	14,1	27,1	26,1
17,5		28,0	26,4

Tempo até exaustão (min)

CO	IC	COR
18,5	12,3	14,4
22,0	13,0	16,3
21,0	13,0	16,2
17,0	16,2	15,4
15,4	12,3	11,2
17,0	16,5	16,3
13,0	16,2	12,3
17,2		15,0

% de fodrina clivada no plantar

CO	IC	COTF	ICTF
0,65	0,58	0,48	0,62
0,49	0,62	0,54	0,40
0,60	0,61	0,61	0,69
0,69	0,67	0,65	0,43
0,63	0,51	0,55	0,52
	0,55		

% de fodrina clivada no sóleo

CO	IC	COTF	ICTF
0,51	0,73	0,49	0,26
0,76	0,69	0,34	0,19
0,87	0,55	0,29	0,43
		0,47	0,20

% de talina clivada no plantar

CO	IC	COTF	ICTF
0,67	0,53	0,48	0,50
0,42	0,46	0,57	0,53
0,51	0,46	0,54	0,47
0,51	0,54	0,51	0,55
0,52	0,50	0,44	0,56
0,46	0,52	0,50	0,57
		0,56	0,55

% de talina clivada no sóleo

CO	IC	COTF	ICTF
0,54	0,61	0,44	0,48
0,65	0,62	0,44	0,50
0,53	0,51	0,45	0,48
		0,48	