

*Ricardo Luiz Damatto*

# **Caracterização Morfológica, Bioquímica e Molecular do Músculo Esquelético Sóleo de Ratos Espontaneamente Hipertensos com Insuficiência Cardíaca**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva**

**Botucatu – São Paulo  
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Damatto, Ricardo Luiz.

Caracterização morfológica, bioquímica e molecular do músculo esquelético sóleo de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca / Ricardo Luiz Damtto. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Marina Politi Okoshi  
Co-orientadora: Maeli Dal Pai Silva  
Assunto CAPES: 40101100

1. Hipertensão arterial    2. Insuficiência cardíaca

Palavras-chave: Atrofia; Fatores de regulação miogênica; Miostatina; Músculo esquelético; Rato espontaneamente hipertenso

**Dedicatória**

Aos meus pais, ERVAL RAFAEL DAMATTO e JACIRA ROSSINI DAMATTO, referências de sabedoria e perseverança. Devo a vocês minha formação moral e intelectual, minha gratidão e reconhecimento!

Aos meus irmãos ERVAL RAFAEL DAMATTO JÚNIOR e FELIPE CESAR DAMATTO, meu respeito, amizade e admiração.

# **Agradecimientos**

A DEUS, por minha vida, pela saúde, oportunidades e pelo convívio com pessoas sensacionais!

A Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela orientação, ensino, cobranças e compromisso profissional! A senhora, minha eterna gratidão!

Aos meus amigos: ALINE, A. LEOPOLDO, A. NASCIMENTO, ANA PAULA, CAMILA BONOMO, DANIELE, DIJON, GABRIEL, MARCELO, MARIA TERESA, PAULA, SANDRA e SILVIO pelos inúmeros momentos de alegria!

Aos meus companheiros nesta jornada: BRUNA, CAMILA GIMENEZ, CAMILA ROSA, FABIANA, HELOÍSA, JULIANA, LIDIANE, MARCOS MINICUCCI, MARIELE, NATASHA, OLGA, PAULA SCHIMIDT, PRISCILA, RENATA e SANDRO que compartilharam das mesmas dificuldades e expectativas!

Aos alunos de iniciação científica: ADRIANA, ALBANO, ARIANE, ARTHUR, BRUNO, CARLOS, CAROL, DANIELLE, FERNANDA, LORENA, LOUISE, MIRIANE, PAULINHA, REGIANE pela parceria nos trabalhos.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: ALEXANDRE LUÍS LOUREIRO, ANA MARIA MENGUE, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISANGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MARIO AUGUSTO DALLAQUA e RENATO BORGES PEREIRA, pela atenção e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: ANDRÉA PAULA LONGO DEVIDÉ, JANETE APARECIDA HERCULANO NUNES SILVA, LÍLIAN CRISTINA NADAL BIANCHI NUNES, NATHANAEL PINHEIRO SALLES e REGINA CÉLIA SPADIN pela atenção e por todo auxílio.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental: JOSÉ CARLOS GEORGETE, MÁRIO BRUNO, CAMILA, CORINA, DE LALLA, ELENIZE, JOSÉ APARECIDO, ÂNGELO, ROGÉRIO, SUELI CLARA, SUELI GARCIA e VITOR pelo bom relacionamento ao longo destes anos.

Aos Professores: Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, Prof. Dr. LEONARDO ZORNOFF, Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO, Prof. Dr. MARIO MATHEUS SUGIZAKI e Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI pela amizade e pronta colaboração profissional.

Também agradeço à Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA, pelas inúmeras contribuições prestadas para a realização desta dissertação e por contar com sua co-orientação.

A CAPES, FUNDUNESP, CNPQ e FAPESP pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

## **Sumário**

Resumo .....	1
Abstract .....	4
Introdução .....	7
Material e Métodos .....	13
Resultados .....	21
Discussão .....	43
Referências Bibliográficas .....	49

**Resumo**

A insuficiência cardíaca (IC) caracteriza-se por redução da tolerância aos exercícios com a ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Além de disfunção cardíaca e pulmonar, anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética têm sido responsabilizadas pela intolerância aos esforços físicos. Em músculos periféricos e respiratórios, frequentemente são observadas atrofia e modificação nas isoformas das cadeias pesadas de miosina (MyHC) na IC. Os mecanismos e vias intracelulares de sinalização responsáveis por essas alterações ainda não estão completamente definidos. Em modelos experimentais de IC induzida por estenose aórtica ou infarto do miocárdio, verificamos que alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica e da via miostatina/folistatina podem modular o trofismo muscular e a composição das MyHCs. Um dos modelos experimentais muito utilizados para o estudo da IC é o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Estes animais apresentam, precocemente, hipertensão arterial e hipertrofia ventricular esquerda e, em idade avançada, desenvolvem IC. Não identificamos estudos que avaliaram o comprometimento da musculatura esquelética de SHR com IC. O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações da musculatura esquelética de SHR com IC por meio de avaliação da morfologia, das isoformas das cadeias pesadas de miosina e da expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica e da via miostatina/folistatina. Métodos: A partir de 18 meses de idade, ratos espontaneamente hipertensos foram avaliados duas vezes por semana à procura de evidências clínicas de IC como taquipnéia, perda de peso e apatia. Após a detecção de IC, os animais foram submetidos a ecocardiograma transtorácico para a confirmação de disfunção ventricular e eutanasiados. No momento da eutanásia, foram avaliados sinais anátomo-patológicos de IC como derrame pleuropericárdico, ascite, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia ventricular direita e congestão pulmonar. O músculo esquelético sóleo foi coletado para análise. Ratos Wistar-Kyoto de mesma idade foram usados como controle. A morfologia foi avaliada em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina e picro-sirius red e as isoformas das miosinas foram analisadas por eletroforese de proteínas. A expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica miogenina, MyoD e MRF4 e da via miostatina/folistatina foi avaliada por PCR em tempo real e por Western blot,

respectivamente. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *t* de Student. O nível de significância foi de 5%. Resultados: Todos os ratos espontaneamente hipertensos tiveram taquipnéia e hipertrofia ventricular direita. Outros sinais de IC tiveram frequência variável entre 38 % e 88 %. Nenhum rato do grupo WKY apresentou quaisquer dos sinais de IC. A avaliação ecocardiográfica mostrou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas, hipertrofia do ventrículo esquerdo e disfunção ventricular sistólica e diastólica no grupo SHR. O peso do músculo sóleo foi menor nos SHR. À morfometria, o grupo SHR apresentou redução da área seccional das fibras (WKY  $3.615 \pm 412$ ; SHR  $2.035 \pm 224 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$ ) e aumento da fração intersticial de colágeno intersticial (WKY  $2,61 \pm 0,39$ ; SHR  $4,88 \pm 0,98$  %;  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo WKY. A eletroforese das proteínas mostrou redução da isoforma IIa das cadeias pesadas de miosina nos SHR. A expressão gênica da miogenina, MyoD e miostatina foi reduzida no grupo SHR. Não houve diferença entre os grupos na expressão gênica do MRF4 e folistatina. A expressão protéica da miogenina, miostatina e folistatina foi menor nos SHR. A expressão protéica da MyoD foi semelhante entre os grupos e a do MRF4 foi maior no grupo SHR. Conclusão: A miopatia associada à insuficiência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos é caracterizada por importante atrofia muscular, fibrose intersticial e alteração no padrão das isoformas das cadeias pesadas de miosina, com redução das isoformas do tipo II. A expressão protéica reduzida de miogenina, miostatina e folistatina parece ter participação no desenvolvimento de atrofia muscular. A diminuição da expressão gênica de MyoD e o aumento da expressão protéica de MRF4 parecem estar envolvidas na alteração das isoformas das cadeias pesadas de miosina.

**Abstract**

Heart failure (HF) is characterized by limited exercise tolerance due to increased muscle fatigue and impaired endurance. Besides cardiac and pulmonary dysfunction, intrinsic skeletal muscle abnormalities have been shown to be involved on reduced exercise tolerance. Muscle mass loss and a shift in myosin heavy chain (MyHC) isoforms have been frequently observed in peripheral and respiratory skeletal muscles during HF. The pathophysiological mechanisms and intracellular pathways responsible for muscle changes are not completely defined. We observed that myogenic regulatory factors expression and myostatin/follistatin pathway modulate muscle trophism and MyHC isoforms in experimental aortic stenosis- and myocardial infarction-induced HF. The spontaneously hypertensive rat (SHR) is often used in HF studies. These rats develop systemic arterial hypertension and left ventricular hypertrophy early and HF at 18-22 month-age approximately. To the best of our knowledge, there is no study on skeletal muscle evaluation in SHR with HF. The aim of this study was to characterize skeletal myopathy of SHR with HF by evaluating soleus muscle morphology, MyHC isoforms, and gene and protein expression of myogenic regulatory factors, myostatin, and follistatin. Methods: Eighteen month-old spontaneously hypertensive rats were evaluated twice a week to identify HF clinical features such as tachypnea, weight loss, and apathy. After detecting HF, rats were subjected to transthoracic echocardiogram. During euthanasia, we evaluated pathological evidences of HF such as pleuropericardial effusion, ascites, left atrial thrombi, right ventricular hypertrophy, and lung congestion. Age-matched Wistar-Kyoto rats were used as controls. Soleus morphology was analyzed in haematoxylin and eosin and picro-sirius red stained sections, and MyHC isoforms were evaluated by protein electrophoresis. The myogenic regulatory factors myogenin, MyoD, and MRF4, myostatin, and follistatin gene and protein expression was analyzed by real time RT PCR and Western blot, respectively. Data are expressed as mean and standard deviation. Comparisons between groups were performed with Student's *t* test. Significance level was 5%. Results: All SHR presented tachypnea and right ventricular hypertrophy. Other HF evidences had a frequency between 38 % e 88 %. None WKY rat presented any HF evidence. Echocardiographic evaluation showed left chambers dilation, left

ventricular hypertrophy, and left ventricular systolic and diastolic dysfunction in the SHR compared to the WKY group. Soleus weight was lower in the SHR group. Fiber cross sectional areas were lower (WKY  $3,615 \pm 412$ ; SHR  $2,035 \pm 224 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0.001$ ), and collagen fractional area was higher (WKY  $2.61 \pm 0.39$ ; SHR  $4.88 \pm 0.98$  %;  $p < 0.001$ ) in the SHR group. Protein electrophoresis showed a decreased IIa MyHC isoform in SHR. Myogenin, MyoD, and myostatin gene expression was reduced in the SHR group. There was no difference between groups for MRF4 and follistatin gene expression. Myogenin, myostatin, and follistatin protein expression was lower in the SHR group. Protein expression of MyoD was similar between groups and MRF4 was higher in SHR. Conclusion: Heart failure-associated skeletal myopathy is characterized by severe atrophy, interstitial fibrosis, and decreased IIa myosin heavy chain isoform in spontaneously hypertensive rats. Reduced myogenin, myostatin, and follistatin protein expression seems to participate on muscle atrophy. Decreased MyoD gene expression and increased MRF4 protein expression are suggested to be involved in the myosin heavy chain isoform shift.

# **Introdução**

A insuficiência cardíaca crônica constitui um problema clínico de grande importância devido à gravidade de suas manifestações e à sua grande prevalência. Estatísticas dos Estados Unidos mostram que a prevalência de insuficiência cardíaca é variável de acordo com a idade, ocorrendo em 0,4 a 2% da população total, chegando a atingir 6 a 10% das pessoas com mais de 65 anos de idade <sup>1</sup>. No Brasil, conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a insuficiência cardíaca encontra-se entre as principais causas de internação hospitalar, considerando-se todas as internações do Sistema Único de Saúde <sup>2</sup>.

Entre os sintomas decorrentes da insuficiência cardíaca crônica, estão a dispnéia e a fadiga que se manifestam, principalmente, durante esforços físicos. Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento desses sintomas em pacientes com insuficiência cardíaca vêm sendo estudados nas últimas décadas <sup>3,4</sup>. Inicialmente, considerava-se que a capacidade reduzida para exercícios físicos era causada por diminuição da capacidade funcional do coração e pulmão e pobre perfusão tecidual devida à redução do débito cardíaco. A suposição inicial de que a capacidade para exercícios pudesse relacionar-se diretamente com a função ventricular não se confirmou, tendo sido observada pobre correlação entre variáveis hemodinâmicas e tolerância ao exercício em doentes com insuficiência cardíaca <sup>5,6</sup>. Mais recentemente, como várias alterações da musculatura esquelética foram descritas, tanto em humanos como em modelos experimentais de falência cardíaca, foi aventado que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética pudessem ter papel na redução da capacidade para realizar exercícios físicos na insuficiência cardíaca crônica <sup>7-9</sup>.

A avaliação da musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca tem incluído aspectos morfológicos, bioquímicos, moleculares e funcionais. Entre as alterações morfológicas mais frequentemente descritas em estudos clínicos e experimentais, encontra-se a diminuição da massa muscular esquelética <sup>10-19</sup>. Em pacientes com insuficiência cardíaca crônica em tratamento ambulatorial, redução da musculatura esquelética foi observada em 68% dos casos <sup>20</sup>, principalmente em músculos dos membros inferiores <sup>21</sup>. A diminuição da massa muscular pode ser decorrente de atrofia <sup>10,11,18</sup> ou de apoptose de células musculares <sup>22-24</sup>. Uma vez que a quantidade de massa muscular é intimamente

relacionada à capacidade para desenvolver força, reduções da massa têm papel importante na limitação para exercícios e atividades cotidianas. Em trabalhos experimentais, outras alterações morfológicas também foram observadas como aumento de fibrose intersticial <sup>24</sup>, redução do número de mitocôndrias <sup>4</sup> e diminuição da densidade capilar <sup>4</sup>.

Diversas alterações metabólicas também foram descritas na insuficiência cardíaca crônica. Em biópsias de músculos esqueléticos de doentes ou em animais, foram observadas anormalidades de enzimas oxidativas e lipolíticas <sup>8,9,12,25</sup>, depressão da função da creatina quinase mitocondrial e redução da concentração de ATP <sup>26,27</sup>. Como depleção anormal de fosfocreatina e acidose durante exercício físico foram detectadas na ausência de alterações do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, assume-se que as anormalidades metabólicas musculares são intrínsecas e não decorrentes de má perfusão tecidual <sup>26</sup>.

Provavelmente em decorrência das anormalidades morfológicas e metabólicas, alterações funcionais também têm sido descritas nos músculos esqueléticos. Pacientes com insuficiência cardíaca freqüentemente apresentam diminuição da capacidade para desenvolver força muscular. Inicialmente, a redução da força fora atribuída à diminuição da massa muscular. Posteriormente, foi verificado que a força muscular é reduzida mesmo após correção de seus valores para a massa muscular, sugerindo que a insuficiência cardíaca é associada a disfunção contrátil do músculo esquelético <sup>13,21,28</sup>. Mesmo em situações de insuficiência cardíaca estável, pôde-se observar redução da força muscular e da capacidade para exercícios físicos <sup>28</sup>.

As proteínas miofibrilares miosina e actina têm particular importância na manutenção da massa e função muscular. Elas constituem grande porcentagem da proteína muscular total e são diretamente responsáveis pela contração muscular. Na insuficiência cardíaca, habitualmente ocorre aumento das fibras esqueléticas tipo II, rápidas, predominantemente compostas por pelas isoformas II das cadeias pesadas de miosina (MyHC), e redução das fibras tipo I, lentas, predominantemente compostas por isoformas I das MyHC <sup>15,29-32</sup>. A alteração da composição das miofibrilas está relacionada à gravidade da

insuficiência cardíaca <sup>31</sup>, mas não tem relação com o grau de atrofia ou com o fluxo sanguíneo muscular <sup>29</sup>, e pode ocorrer independentemente de variações no nível de atividade física <sup>33</sup>.

As causas responsáveis pela atrofia muscular e pela modificação das isoformas da MyHC na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente definidas. Ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas, redução da síntese protéica e/ou aumento do catabolismo muscular, diminuição da atividade física e neuromuscular e ocorrência de apoptose podem estar envolvidos nas alterações <sup>15,34</sup>. Do mesmo modo, não são conhecidos os mecanismos moleculares e as vias sinalizadoras que controlam a expressão gênica das MyHC e o trofismo de músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca. Somente na última década, as vias de sinalização intracelular e o papel de mecanotransdutores envolvidos na indução de atrofia muscular de várias causas como envelhecimento, inatividade e doença, começaram a ser melhor entendidos <sup>35</sup>.

Há substancial evidência que os fatores de regulação miogênica (MRF) MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 atuam como importantes reguladores da expressão de proteínas musculares <sup>36-39</sup>. Os MRF são fatores transcricionais que ativam a expressão de genes específicos do músculo por meio de ligação a elementos de controle no DNA, conhecidos como E-box, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos. A miogenina é expressa em maior quantidade que a MyoD em músculos lentos, enquanto o oposto ocorre em músculos rápidos <sup>36,37,40</sup>. Poucos estudos avaliaram a expressão dos MRF na insuficiência cardíaca. Em ratos com hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca direita, foi observada redução da expressão gênica da MyoD e MRF4 em músculos esqueléticos <sup>41</sup>. Em nosso laboratório, mostramos que ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio apresentam diminuição da expressão gênica da miogenina no músculo sóleo <sup>10</sup>. É importante salientar que, nesses estudos, não foi detectada alteração na composição das MyHC e, portanto, não é conhecido o envolvimento dos MRF na regulação do fenótipo das miofibrilas.

Recentemente, foi relatado que a miostatina pode ter papel importante na regulação da massa muscular esquelética em diversas condições

clínicas. Previamente denominada GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8), a miostatina foi descoberta em pesquisa para identificar novos membros da super família TGF- $\alpha$  (fator transformador do crescimento-8) de fatores de diferenciação e crescimento celular <sup>42,43</sup>. A miostatina é sintetizada por células musculares esqueléticas. Estudos sobre seu papel fisiológico mostraram correlação negativa entre expressão gênica da miostatina e massa muscular, o que sugere seu potencial para induzir hipotrofia da musculatura esquelética <sup>42,44-46</sup>. A ação da miostatina pode ser modulada por várias proteínas. Uma das mais estudadas é a folistatina, que tem a propriedade de se unir à miostatina e inibir sua habilidade para se ligar aos receptores celulares. Estudos sugerem que a folistatina pode atuar como um potente antagonista da miostatina e modificar sua atividade *in vivo* <sup>47-49</sup>. Poucos autores avaliaram a via miostatina/folistatina na insuficiência cardíaca. Recentemente, Lenk et al. <sup>50</sup> observaram aumento na expressão protéica da miostatina no músculo gastrocnêmio de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Em nosso laboratório, verificamos que ratos com insuficiência cardíaca crônica apresentam atrofia do músculo sóleo na ausência de alterações da expressão gênica e protéica da miostatina. Entretanto, a expressão protéica da folistatina foi reduzida <sup>11</sup>. Como a folistatina é antagonista da miostatina, sua redução pode ter colaborado para aumentar a atividade da miostatina e induzir atrofia muscular.

Um dos modelos experimentais muito utilizados para o estudo da fisiopatologia e tratamento da insuficiência cardíaca é o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Estes animais foram introduzidos por Okamoto e Aoki como um modelo de hipertensão genética semelhante à humana <sup>51</sup>. Os ratos manifestam a hipertensão arterial sistêmica a partir de um mês de idade, que é acompanhada pelo desenvolvimento precoce de hipertrofia ventricular esquerda <sup>52</sup>. A seguir, apresentam período relativamente longo de hipertrofia compensada, no qual a função cardíaca se encontra preservada. A partir de aproximadamente 18 meses de idade, os animais começam a apresentar evidências de disfunção cardíaca e, entre 18 e 24 meses, manifestam quadro clínico e anátomo-patológico de insuficiência cardíaca <sup>53,54</sup>. Devida à evolução lenta da fase de hipertrofia ventricular compensada para a fase de insuficiência cardíaca, considera-se que o

modelo é muito útil para mimetizar situações clínicas de insuficiência cardíaca. Apesar dos vários estudos sobre alterações da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca, não há relatos sobre as condições dos músculos esqueléticos periféricos em ratos SHR na fase de insuficiência cardíaca.

O objetivo deste estudo é caracterizar as alterações da musculatura esquelética de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca por meio de avaliação da morfologia, da composição das cadeias pesadas de miosina e da expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica e da via miostatina/folistatina do músculo sóleo.

## **Material e Métodos**

## Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Os animais foram alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e com ciclos de luminosidade de 12 h. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Foram constituídos dois grupos experimentais:

- 1) grupo insuficiência cardíaca (SHR-IC, n=15), formado por SHR com insuficiência cardíaca;
- 2) grupo controle (WKY, n=10), formado por ratos Wistar-Kyoto de mesma idade que os SHR.

Quando os ratos atingiram a idade de 15 meses, foi mensurada a pressão arterial caudal para comprovação da hipertensão arterial. Após os 18 meses, os animais foram avaliados duas vezes por semana à procura de sinais clínicos de insuficiência cardíaca que incluem perda de peso, apatia, taquipnéia e dispnéia<sup>54-56</sup>. Após a detecção desses sinais, foi realizado ecocardiograma transtorácico para confirmação da presença de disfunção ventricular. A seguir, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/kg) e eutanasiados. No momento da eutanásia foram avaliados os seguintes sinais anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca: ascite, congestão hepática, derrame pleuro-pericárdico, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/kg) e peso dos pulmões, em valor absoluto e normalizado pelo peso corporal<sup>57</sup>. Os ratos Wistar-Kyoto, que compõem o grupo controle, foram eutanasiados com a mesma idade que os SHR.

No final do período experimental, os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). O coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios foram

removidos e os ventrículos direito (VD) e esquerdo foram pesados separadamente. As relações entre peso dos ventrículos direito e esquerdo e o peso corporal foram utilizadas como índices de hipertrofia ventricular.

A seguir, foram dissecados os músculos sóleo dos membros pélvicos direito e esquerdo. O tecido epitelial do membro pélvico foi removido e o músculo gastrocnêmio rebatido para exposição do músculo sóleo, que foi, então, retirado. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. Fragmentos de pulmão, fígado e ventrículo direito e átrios foram colhidos para cálculo da relação peso úmido/peso seco para avaliar o grau de edema nos tecidos.

### **Avaliação hemodinâmica**

A pressão arterial caudal e a frequência cardíaca (FC) foram aferidas indiretamente na cauda do animal aos 15 meses. Os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40 °C por 5 minutos e as medidas determinadas por pletismografia, utilizando-se esfigmomanômetro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, USA) <sup>58</sup>.

### **Avaliação estrutural e funcional do coração por ecocardiograma**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intramuscular, para o estudo ecocardiográfico. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma utilizando-se equipamento da Philips, modelo HDI-5000 (Washington, USA), dotado de transdutor multifrequencial de 5,0 a 12,0 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório <sup>59-61</sup>. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da

American Society of Echocardiography <sup>62</sup>. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular e diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico ( $\square D$ ):  $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$ ; 2) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

### **Análises morfométricas**

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido muscular foram transferidas para câmara do micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 minutos para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras musculares com espessura de 8  $\mu\text{m}$ . A seguir, os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina. Em cada lâmina, foi efetuada a mensuração da área seccional das fibras musculares, segundo os critérios preconizados por Dubowitz <sup>63</sup>, em amostras de pelo menos 150 fibras do músculo sóleo. Outras lâminas foram coradas por picro-sirius red e utilizadas para quantificação da fração de colágeno intersticial, mensurada em pelo menos 20 campos histológicos. A fração de colágeno intersticial foi correspondente à porcentagem de tecido colágeno em relação à área total do músculo. Na avaliação, não foram incluídas regiões perivasculares. As análises morfométricas foram realizadas em sistema de análise de imagem

computadorizado com o auxílio de microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

### **Avaliação das isoformas das cadeias pesadas da miosina por eletroforese**

A análise das isoformas das cadeias pesadas da miosina foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Fragmentos congelados do músculo sóleo (80 a 100 mg), foram trituradas e homogeneizadas em solução de extração (pH=7) composta por: tampão fosfato de potássio 50 mM; sucrose 0,3 M; ditioneitol (DTT) 0,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM (pH=8); fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,3 mM; fluoreto de sódio (NaF) 10 mM; e inibidor de protease (diluição final 1:100). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C, durante 20 minutos. A alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação de proteína total, segundo o método de Bradford (1976). Quinze µL de extrato de proteína foram colocados em gel de separação SDS-PAGE em gradiente de 7-10% com gel de empacotamento a 4%. A corrida no gel foi feita por 24 a 30 h a 120 V e os géis foram corados por Coomassie blue. As isoformas das cadeias pesadas de miosina foram identificadas de acordo com a massa molecular e suas porcentagens relativas foram quantificadas por densitometria <sup>15</sup>.

### **Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR em tempo real**

A análise da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina e MRF4), da miostatina, folistatina e do gene constitutivo ciclofilina foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa <sup>11</sup>.

### **Extração de RNA com TRIzol**

O fragmento muscular congelado foi homogeneizado em Polytron com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido). O homogenato foi transferido

para tubo de 1,5 mL e incubado por 5 min à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e precipitada por intermédio de incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado) por 10 min, à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4 °C. O sedimento de RNA secou por 10 min à temperatura ambiente e foi ressuspensão em solução 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60 °C, por 10 min, para a inativação de possíveis resíduos de RNase. O RNA foi, então, quantificado por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e o fator de diluição do RNA (70). Foi também determinada, por espectrofotometria, a razão entre 260 e 280 nm, o que fornece uma estimativa da qualidade do processo de extração.

### **Gel analítico de agarose para RNA**

Para analisar a integridade do RNA, foi realizada eletroforese (1 µL da solução contendo o RNA total, 1 µL de carregador Orange e 8 µL de água ultra-pura) em gel de agarose (1%), tampão TAE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), corado com brometo de etídio, à voltagem de 60 mV.

### **Transcrição reversa (RT) do RNA**

A RT do RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se os componentes do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Uma mistura contendo 4 µg de RNA total, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix 100 mM, 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de

MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/μL) e 1 μL de RNase Inhibitor, com volume total ajustado para 20 μL de H<sub>2</sub>O Nuclease-Free, foi incubada por 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C e 5 s a 85 °C. A seguir, a mistura de reação foi colocada no gelo e estocada a -80 °C.

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real**

Alíquotas da reação da RT de cada amostra contendo 100 ng de cDNA foram adicionadas a uma mistura contendo 10 μL 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 μL de ensaio customizado (20X) contendo primers “sense” e “anti-sense” e sonda Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene. Foi adicionada água tratada com DEPC para se obter volume final de 20 μL. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene alvo e para o gene constitutivo no Sistema Real Time PCR StepOne® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante: 1 ciclo a 95 °C por 10 min para ativação da AmpliTaq Gold Enzyme; 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 s) e anelamento-extensão (60 °C por 1 min). Para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação mostrando aumento do reporter dye fluorescente (Rn) em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo em que a reação atinge o limiar de detecção (critical threshold cycle - C<sub>T</sub>), baseado na variabilidade dos dados da linha de base obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR. Os primers para os genes analisados foram obtidos através do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de seqüências publicadas no GenBank ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)). Os ensaios (primer + sonda) foram adquiridos diretamente do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e estão apresentados na tabela 1. A quantificação relativa de cada gene, normalizada pela referência endógena (ciclofilina), foi realizada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  <sup>64</sup>.

## **Análise da expressão protéica por Western blot**

A proteína muscular foi extraída em tubo contendo fragmentos congelados do músculo sóleo (80 a 100 mg), foram trituradas e homogeneizadas em solução de extração (pH=7) composta por: tampão fosfato de potássio 50 mM; sucrose 0,3 M; ditioneitol (DTT) 0,5 mM; ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM (pH=8); fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 0,3 mM; fluoreto de sódio (NaF) 10 mM; e inibidor de protease (diluição final 1:100). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C, durante 20 minutos. A alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação de proteína total, segundo o método de Bradford (1976). As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose (Biorad). Após bloqueio da membrana, foi realizada a incubação com anticorpos primários anti- myoD, miogenina, MRF4, miostatina ou folistatina (Santa Cruz Biotechnology). A membrana foi, então, lavada com PBS e Tween 20, incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e, a seguir, lavada com PBS e Tween 20. Os sinais foram visualizados com auxílio de kit para quimioluminescência e auto-radiografia <sup>65</sup>. A seguir, os anticorpos foram removidos da membrana e esta foi novamente incubada com anticorpo anti-GAPDH e anticorpo secundário. Após quantificação, os resultados dos sinais das proteínas alvo foram normalizados para aqueles obtidos com anti-GAPDH.

## **Análise estatística**

Os dados apresentaram distribuição normal e estão expressos em média e desvio padrão. A comparação entre os dois grupos foi realizada pelo teste *t* de Student. A associação entre as variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi de 5%.

## **Resultados**

## **Caracterização dos grupos experimentais e variáveis corporais**

Para caracterizar a presença de insuficiência cardíaca, foram pesquisados *in vivo* e em exame *post mortem* sinais de falência cardíaca em ratos. No grupo SHR (n = 8), todos os ratos tiveram hipertensão arterial sistêmica e insuficiência cardíaca. Os sinais de insuficiência estiveram presentes na seguinte frequência: taquipnéia/dispnéia em todos os animais, derrame pleuropericárdico em 7, ascite em 3, congestão hepática em 3, trombo em átrio esquerdo em 4, aumento do peso do pulmão normalizado pelo peso corporal em 7 e hipertrofia do ventrículo direito em todos os ratos (tabela 2). Nenhum animal do grupo WKY apresentou quaisquer destes sinais (n = 9).

A pressão arterial e as variáveis corporais estão apresentadas na tabela 3. A pressão arterial foi maior e o peso corporal (PC) menor no grupo SHR em relação ao WKY. Os pesos do VE, VD e dos átrios e as relações VE/PC, VD/PC e átrios/PC foram maiores no grupo SHR. A relação entre peso úmido e peso seco do fígado foi maior no grupo SHR; as relações entre peso úmido e peso seco do VD e átrios foram semelhantes entre os grupos. O peso do pulmão em valores absolutos e normalizados pelo peso corporal foi maior no grupo SHR. O peso do músculo sóleo foi menor no grupo SHR que no WKY (WKY  $0,157 \pm 0,029$ ; SHR  $0,129 \pm 0,021$  g;  $p = 0,044$ ).

## **Avaliação ecocardiográfica**

Os parâmetros estruturais cardíacos estão apresentados na tabela 4. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) foi semelhante entre os grupos; porém, quando normalizado pelo PC, foi maior no grupo SHR. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV), os diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) e a relação AE/PC foram maiores no grupo SHR do que no grupo WKY. A relação entre o diâmetro do átrio esquerdo e o diâmetro da aorta (AE/AO) foi semelhante entre os grupos.

Os resultados da avaliação funcional do VE estão apresentados na tabela 5. A porcentagem de encurtamento endocárdico foi menor no grupo SHR. A frequência cardíaca e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foram maiores no grupo SHR que no WKY. As seguintes variáveis apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre os grupos: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), onda A mitral, onda E mitral, relação E/A e tempo de desaceleração da onda E mitral (TDE).

### **Análises morfométricas do músculo sóleo**

A avaliação morfológica geral da musculatura esquelética foi realizada em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. A média das áreas seccionais das fibras do grupo SHR foi menor que a do grupo WKY (WKY  $3.615 \pm 412$ ; SHR  $2.035 \pm 224 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$ ; figuras 1 e 2). A frequência de distribuição das fibras em relação às áreas seccionais está apresentada na figura 3.

A avaliação da fração do colágeno intersticial foi realizada em cortes histológicos corados por picro-sirius red (figura 4). A média da fração de colágeno intersticial foi maior no grupo SHR que no WKY (WKY  $2,61 \pm 0,39$ ; SHR  $4,88 \pm 0,98$  %;  $p < 0,001$ ; figura 5).

### **Avaliação da composição das cadeias pesadas de miosina**

Em lisado de proteínas do músculo sóleo, foram detectadas as isoformas I e IIa das cadeias pesadas de miosina. A porcentagem da isoforma IIa em relação ao total das cadeias pesadas de miosina foi menor no grupo SHR em relação ao controle (WKY  $19,6 \pm 3,33$ ; SHR  $8,8 \pm 3,33$  %;  $p = 0,003$ ; figura 6).

### **Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real**

A expressão gênica da miogenina (WKY  $1,0 \pm 0,37$ ; SHR  $0,45 \pm 0,19$  unidades arbitrárias;  $p = 0,004$ ; figura 7), MyoD (WKY  $1,0 \pm 0,66$ ; SHR  $0,36 \pm 0,21$  unidades arbitrárias;  $p = 0,03$ ; figura 8) e miostatina (WKY  $1,00 \pm 0,45$ ; SHR

0,21 ± 0,26 unidades arbitrárias; p= 0,001; figura 10) foi significativamente diminuída no grupo SHR em relação ao WKY. A expressão gênica do MRF4 (WKY 1,0 ± 0,42; SHR 0,94 ± 0,53 unidades arbitrárias; p= 0,80; figura 9) e da folistatina (WKY 1,0 ± 0,30; SHR 0,77 ± 0,55 unidades arbitrárias; p= 0,35; figura 11) foi estatisticamente semelhante entre os grupos.

### **Análise da expressão protéica por Western blot**

A expressão protéica da MyoD (WKY 1,0 ± 0,16; SHR 0,89 ± 0,22 unidades arbitrárias; p= 0,29; figura 13) foi estatisticamente semelhante entre os grupos e a do MRF4 (WKY 1,0 ± 0,27; SHR 1,53 ± 0,47 unidades arbitrárias; p= 0,014; figura 14) foi maior no grupo SHR que no WKY. A expressão protéica da miogenina (WKY 1,0 ± 0,16; SHR 0,64 ± 0,35 unidades arbitrárias; p= 0,02; figura 12), miostatina (WKY 1,0 ± 0,18; SHR 0,69 ± 0,24 unidades arbitrárias; p= 0,013; figura 15) e folistatina (WKY 1,0 ± 0,17; SHR 0,65 ± 0,16 unidades arbitrárias; p= 0,001; figura 16) foi menor no grupo SHR em relação ao WKY. A expressão protéica da miogenina foi positivamente correlacionada com a área seccional das fibras e negativamente correlacionada com a fração de colágeno intersticial (figura 17). Não houve correlação entre a expressão da miogenina e a isoforma IIa das MyHCs. O MRF4 correlacionou-se negativamente com a isoforma IIa das MyHCs. Houve tendência para correlação negativa entre o MRF4 e a área seccional das fibras (p=0,08) e positiva entre o MRF4 e a porcentagem de colágeno intersticial (p=0,075; figura 18). A expressão protéica da miostatina correlacionou-se significativamente apenas com a área seccional das fibras (figura 19). A folistatina correlacionou-se positivamente com a área seccional e a isoforma IIa das MyHCs, e negativamente com a porcentagem de colágeno intersticial (figura 20).

**Tabela 1.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores

<b>Genes</b>	<b>Nº. Acesso</b>	<b>Ensaio</b>
<b>MyoD</b>	NM_176079	Rn00598571_m1
<b>Miogenina</b>	NM_017115	Rn00567418_m1
<b>MRF4</b>	NM_013172	Rn00565920_m1
<b>Miostatina</b>	NM_019151.1	Rn00569683_m1
<b>Folistatina</b>	NM_012561.1	Rn00561225_m1
<b>Ciclofilina</b>	NM_017101.1	Rn00690933_m1

Nº. Acesso: número de acesso as seqüências publicadas no GenBank

Ensaio: código do ensaio pré-otimizado pela Applied Biosystems

**Tabela 2.** Frequência de sinais clínico e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca no grupo de ratos espontaneamente hipertensos

<b>Sinais</b>	<b>%</b>
<b>Taquipnéia</b>	100
<b>Congestão hepática</b>	37,5
<b>Derrame pleuropericárdico</b>	87,5
<b>Trombo em átrio esquerdo</b>	50
<b>Hipertrofia do ventrículo direito</b>	100
<b>Congestão pulmonar</b>	87,5

**Tabela 3.** Variáveis corporais e anatômicas

<b>Variáveis</b>	<b>WKY (n=9)</b>	<b>SHR (n=8)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>PA</b>	118 ± 10	221 ± 35	<0,001
<b>PC (g)</b>	414 ± 57	295 ± 29	<0,001
<b>VE (g)</b>	0,80 ± 0,14	1,18 ± 0,24	<0,001
<b>VD (g)</b>	0,26 ± 0,04	0,50 ± 0,13	<0,001
<b>Átrios (g)</b>	0,097 ± 0,018	0,243 ± 0,078	<0,001
<b>VE/PC (mg/g)</b>	1,94 ± 0,24	3,97 ± 0,49	<0,001
<b>VD/PC (mg/g)</b>	0,62 ± 0,08	1,70 ± 0,35	<0,001
<b>Átrios/PC (mg/g)</b>	0,27 ± 0,05	0,82 ± 0,21	<0,001
<b>VD úmido/seco</b>	4,49 ± 0,41	4,28 ± 0,54	0,362
<b>Átrio úmido/seco</b>	4,56 ± 0,47	4,95 ± 0,39	0,085
<b>Fígado úmido/seco</b>	3,28 ± 0,07	3,53 ± 0,27	0,016
<b>Pulmão (g)</b>	2,32 ± 0,39	3,65 ± 1,0	0,002
<b>Pulmão/PC (mg/g)</b>	5,67 ± 1,13	12,39 ± 3,35	<0,001

WKY: rato normotenso; SHR: rato espontaneamente hipertenso; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste *t* de Student.

**Tabela 4.** Análise ecocardiográfica de variáveis estruturais do coração

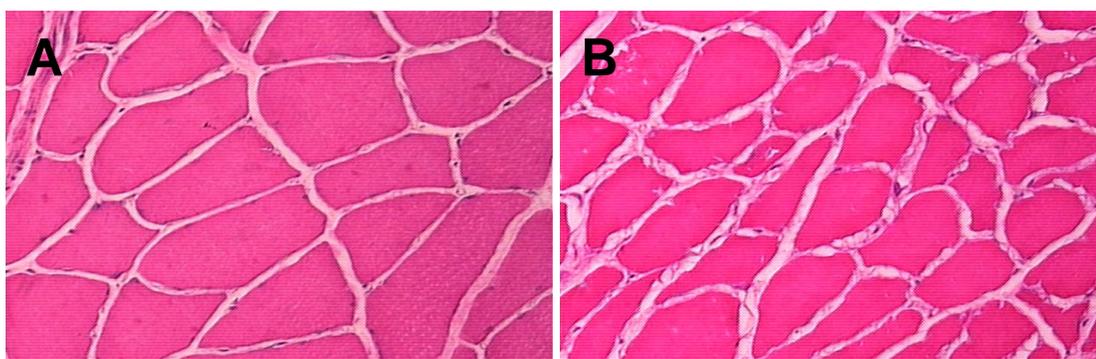
<b>Variáveis</b>	<b>WKY (n=9)</b>	<b>SHR (n=6)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>DDVE (mm)</b>	8,01 ± 0,95	8,64 ± 1,46	0,330
<b>DDVE/PC (mm/kg)</b>	19,6 ± 3,1	27,7 ± 4,7	0,001
<b>DSVE (mm)</b>	3,68 ± 0,92	5,08 ± 1,51	0,043
<b>EDPP (mm)</b>	1,47 ± 0,06	1,82 ± 0,15	<0,001
<b>EDSIV (mm)</b>	1,49 ± 0,05	1,82 ± 0,15	<0,001
<b>AO (mm)</b>	4,49 ± 0,38	4,98 ± 0,34	0,024
<b>AE (mm)</b>	5,73 ± 0,59	7,28 ± 1,17	0,004
<b>AE/AO</b>	1,29 ± 0,19	1,47 ± 0,26	0,139
<b>AE/PC (mm/kg)</b>	13,9 ± 0,89	23,3 ± 3,43	<0,001

WKY: rato normotenso; SHR: rato espontaneamente hipertenso; n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PC: peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste *t* de Student.

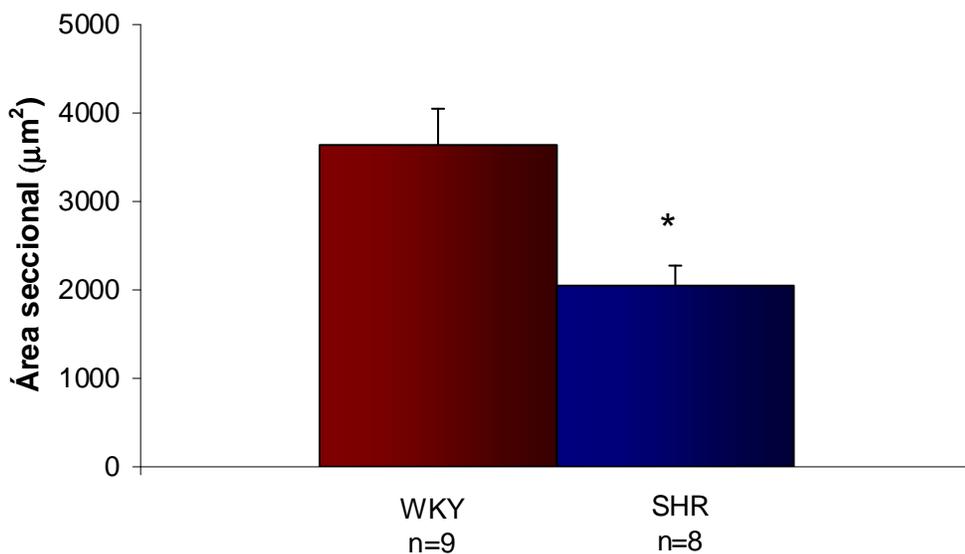
**Tabela 5.** Avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

<b>Variáveis</b>	<b>WKY (n=9)</b>	<b>SHR (n=6)</b>	<b>Valor de p (teste t)</b>
<b>FC (bpm)</b>	253 ± 42	304 ± 21	0,016
<b>ΔD (%)</b>	54,6 ± 6,3	42,2 ± 7,1	0,003
<b>VEPP (mm/s)</b>	32,9 ± 4,1	30,2 ± 4,9	0,256
<b>Onda E (cm/s)</b>	78,1 ± 14,1	71,7 ± 16,8	0,435
<b>Onda A (cm/s)</b>	45,0 ± 11,8	62,5 ± 25,4	0,091
<b>E/A</b>	1,83 ± 0,49	1,58 ± 1,48	0,639
<b>TDE (ms)</b>	44,3 ± 9,04	40,5 ± 14,9	0,646
<b>TRIV (ms)</b>	33,7 ± 4,18	38,0 ± 3,09	0,049

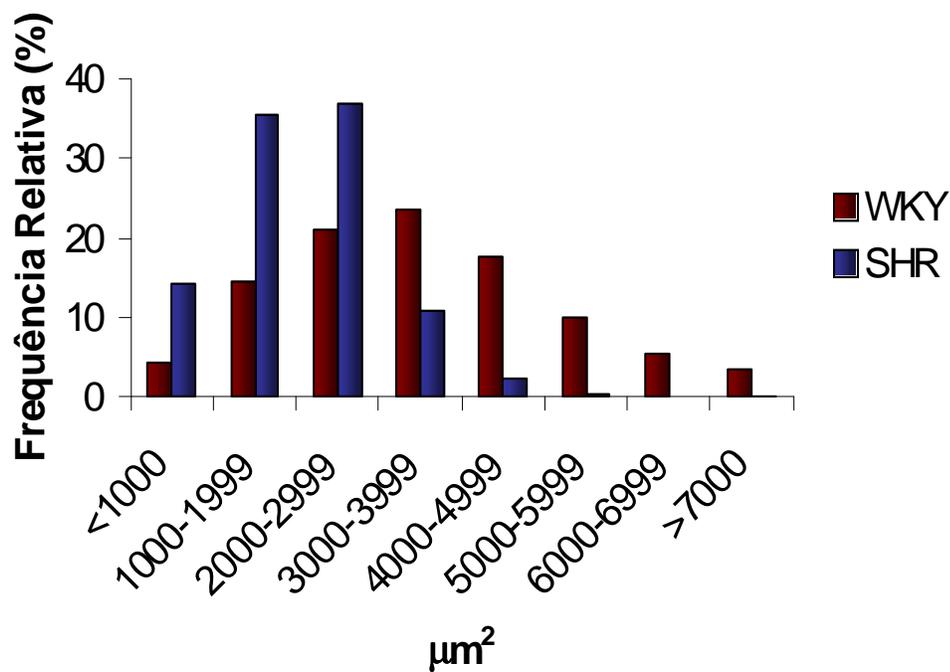
WKY: rato normotenso; SHR: rato espontaneamente hipertenso; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; ΔD: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste *t* de Student.



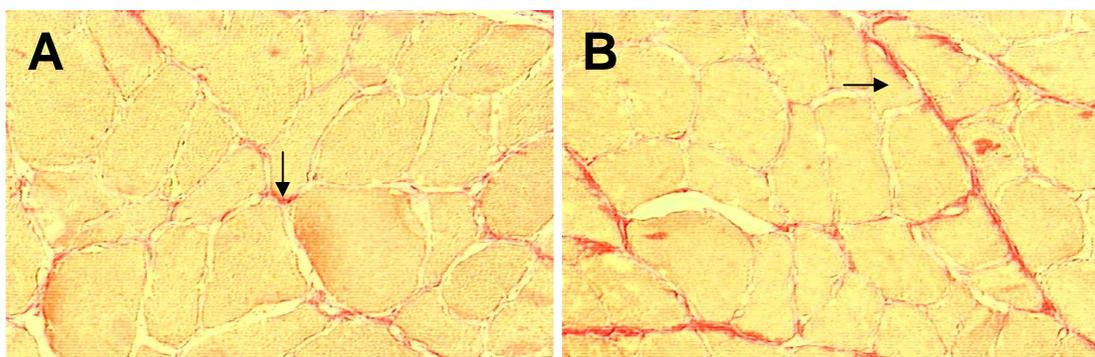
**Figura 1.** Cortes histológicos transversos do músculo esquelético sóleo corados com hematoxilina-eosina. A: ratos Wistar Kyoto; B: ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Objetiva: 40X.



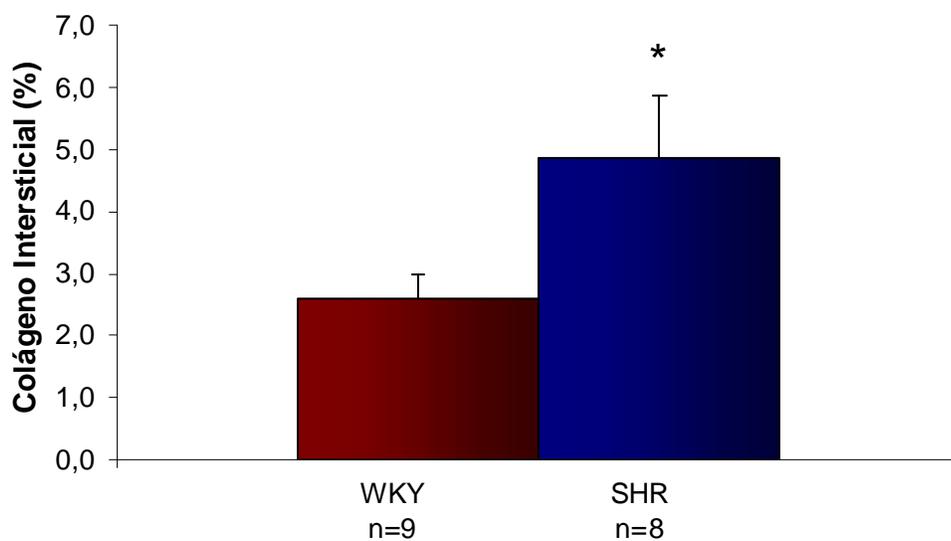
**Figura 2.** Área seccional transversa das fibras do músculo sóleo. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p < 0,001$ .



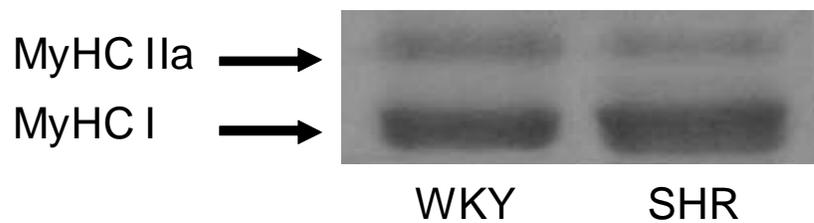
**Figura 3.** Distribuição das fibras musculares do músculo sóleo de acordo com a área seccional; WKY (n=9); SHR (n=8). Dados expressos em porcentagem.



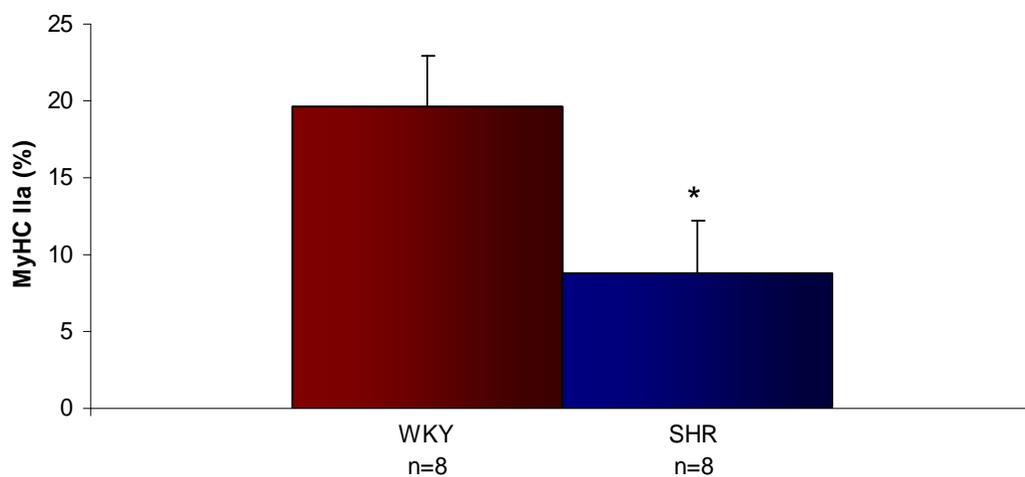
**Figura 4.** Cortes histológicos transversos do músculo sóleo corados com picrosirius red. A: ratos Wistar Kyoto; B: ratos espontaneamente hipertensos; as setas mostram tecido colágeno intersticial. Objetiva: 40X



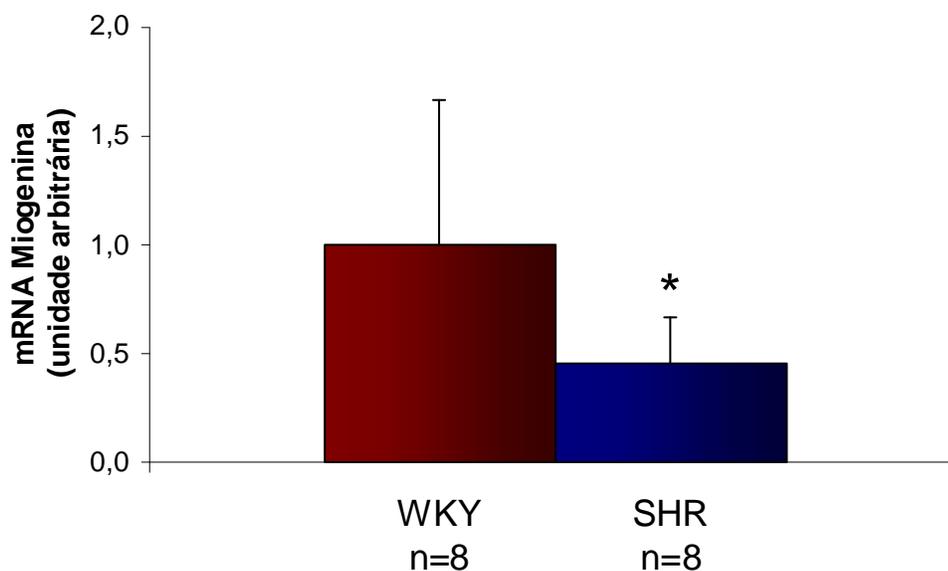
**Figura 5.** Fração de colágeno intersticial. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p < 0,001$ .



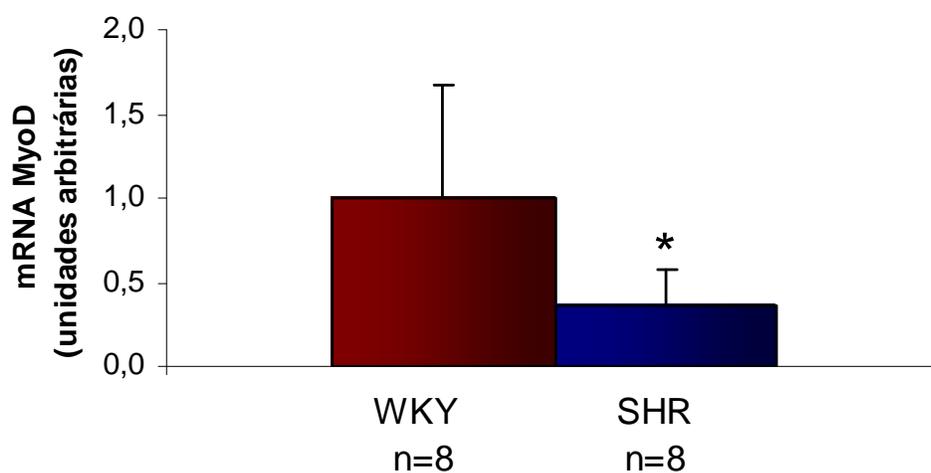
**Figura 6a.** Gel representativo de poliacrilamida e duodecilsulfato de sódio. Isoformas I e IIa das cadeias pesadas de miosina (MyHC) do músculo esquelético sóleo.



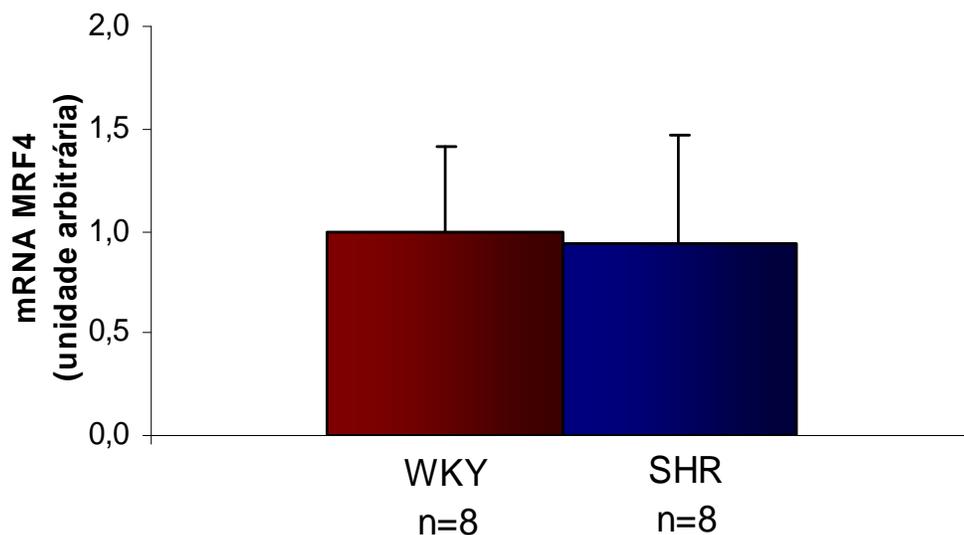
**Figura 6b.** Porcentagem da isoforma IIa das cadeias pesadas de miosina (MyHC) do músculo esquelético sóleo analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e duodecilsulfato de sódio. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,003$ .



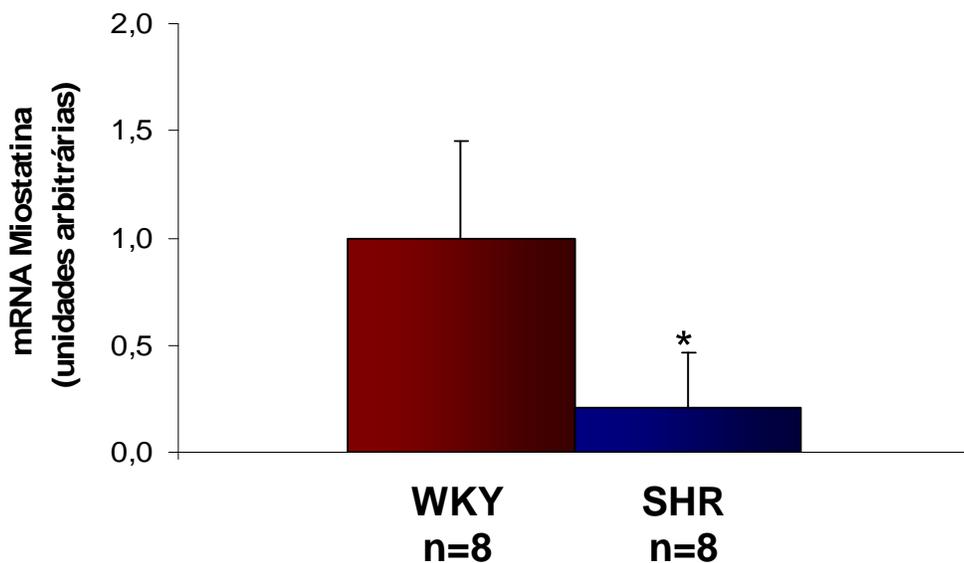
**Figura 7.** Expressão gênica da miogenina no músculo sóleo analisada em reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa em tempo real e normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,004$ .



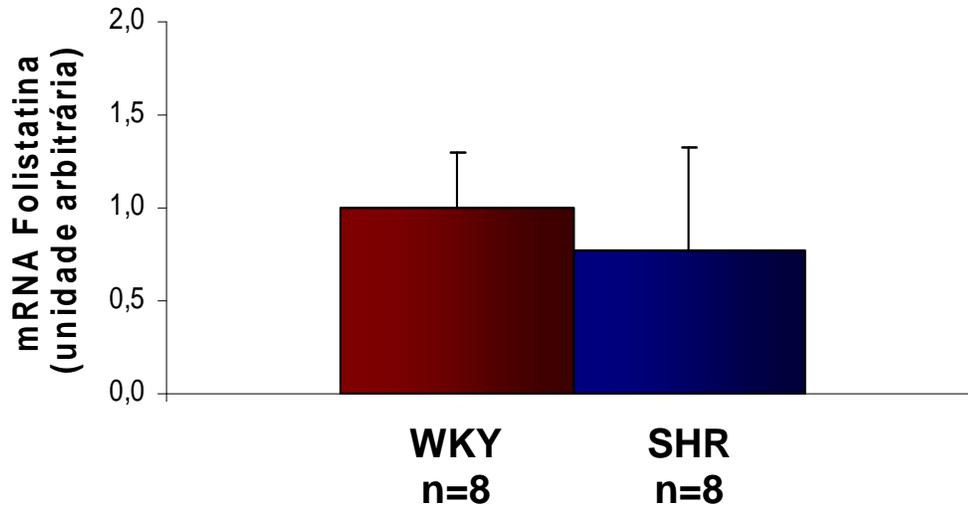
**Figura 8.** Expressão gênica da MyoD no músculo sóleo analisada em reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa em tempo real e normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,003$ .



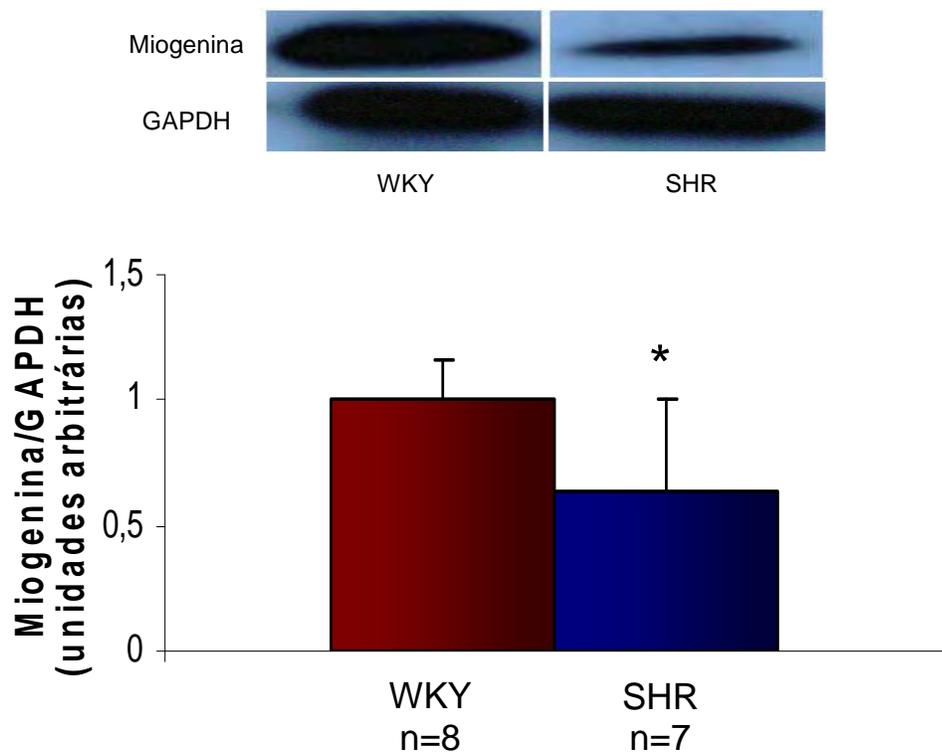
**Figura 9.** Expressão gênica do MRF4 no músculo sóleo analisada em reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa em tempo real e normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



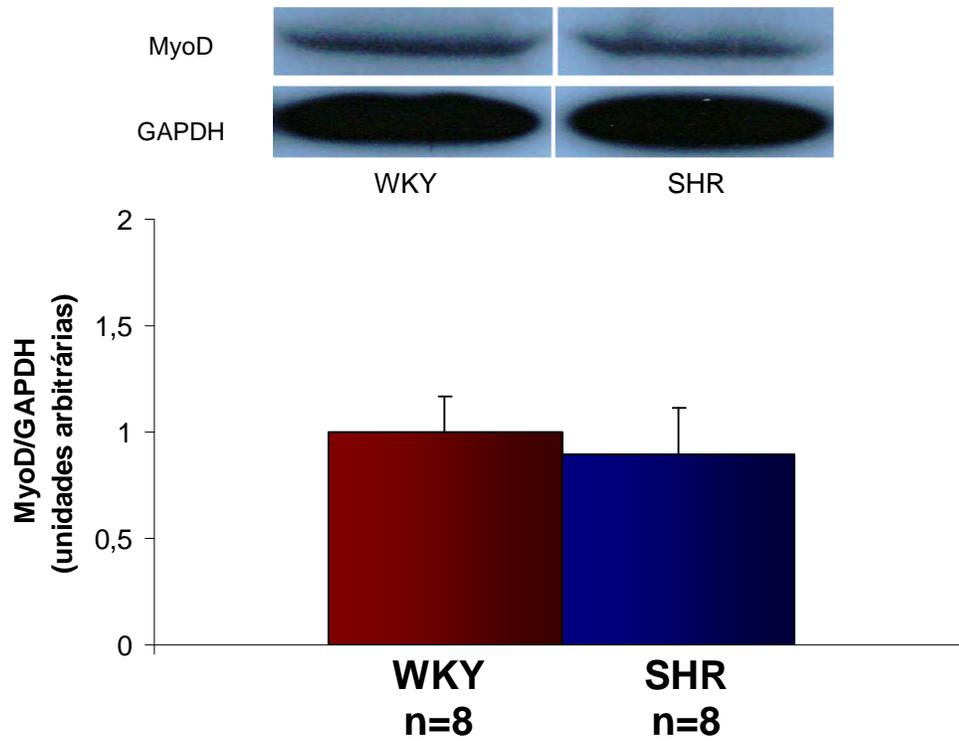
**Figura 10.** Expressão gênica da miostatina no músculo sóleo analisada em reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa em tempo real e normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,001$ .



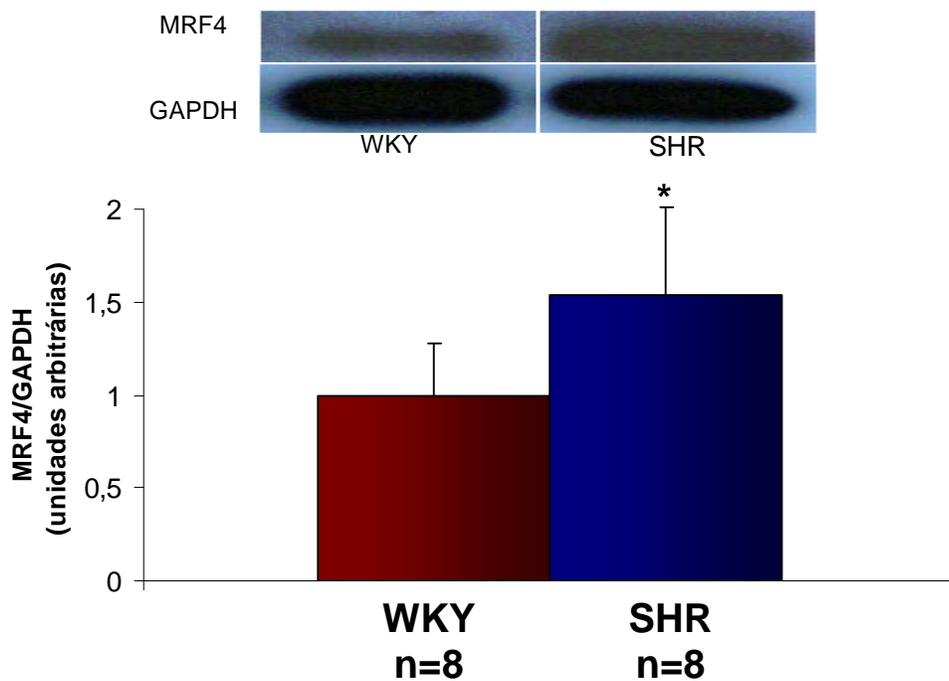
**Figura 11.** Expressão gênica da folistatina no músculo sóleo analisada por meio de reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa em tempo real e normalizada pela expressão do gene constitutivo ciclofilina. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



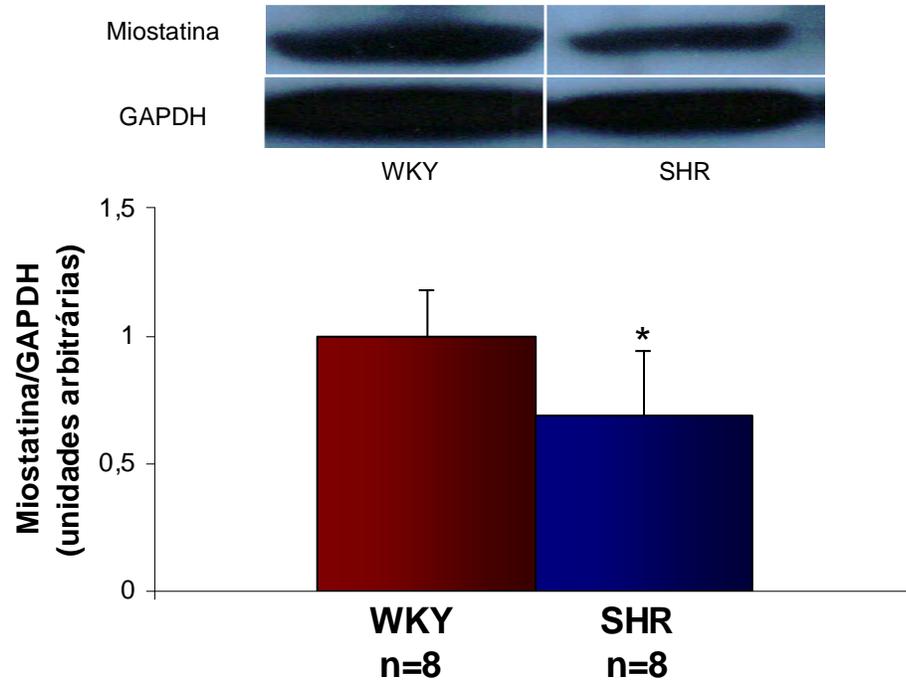
**Figura 12.** Expressão protéica da miogenina no músculo sóleo analisada pela técnica Western blot e normalizada pela expressão protéica do GAPDH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,02$ .



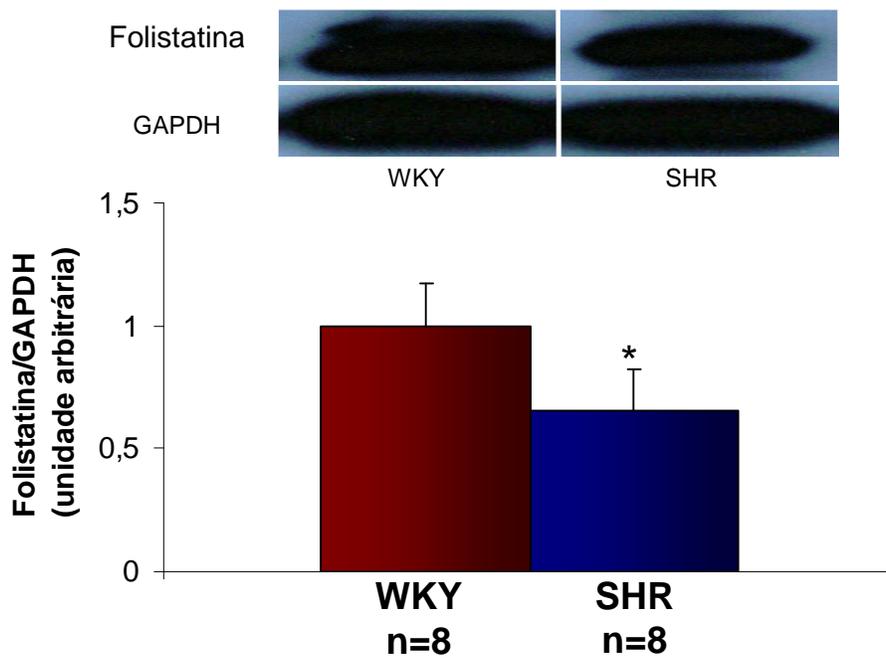
**Figura 13.** Expressão protéica da MyoD no músculo sóleo analisada pela técnica Western blot e normalizada pela expressão protéica do GAPDH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



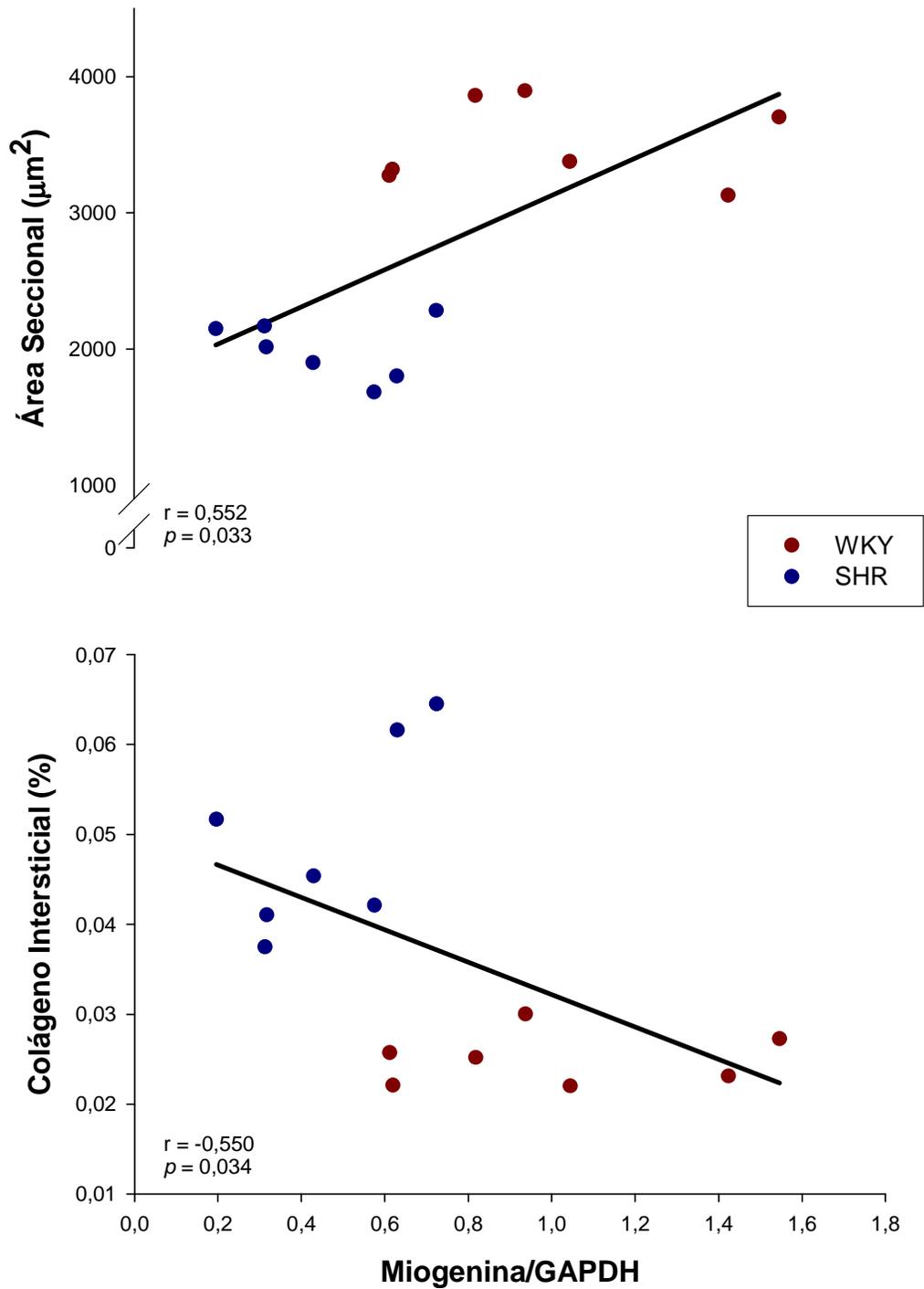
**Figura 14.** Expressão protéica do MRF4 no músculo sóleo analisada pela técnica Western blot e normalizada pela expressão protéica do GAPDH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,014$ .



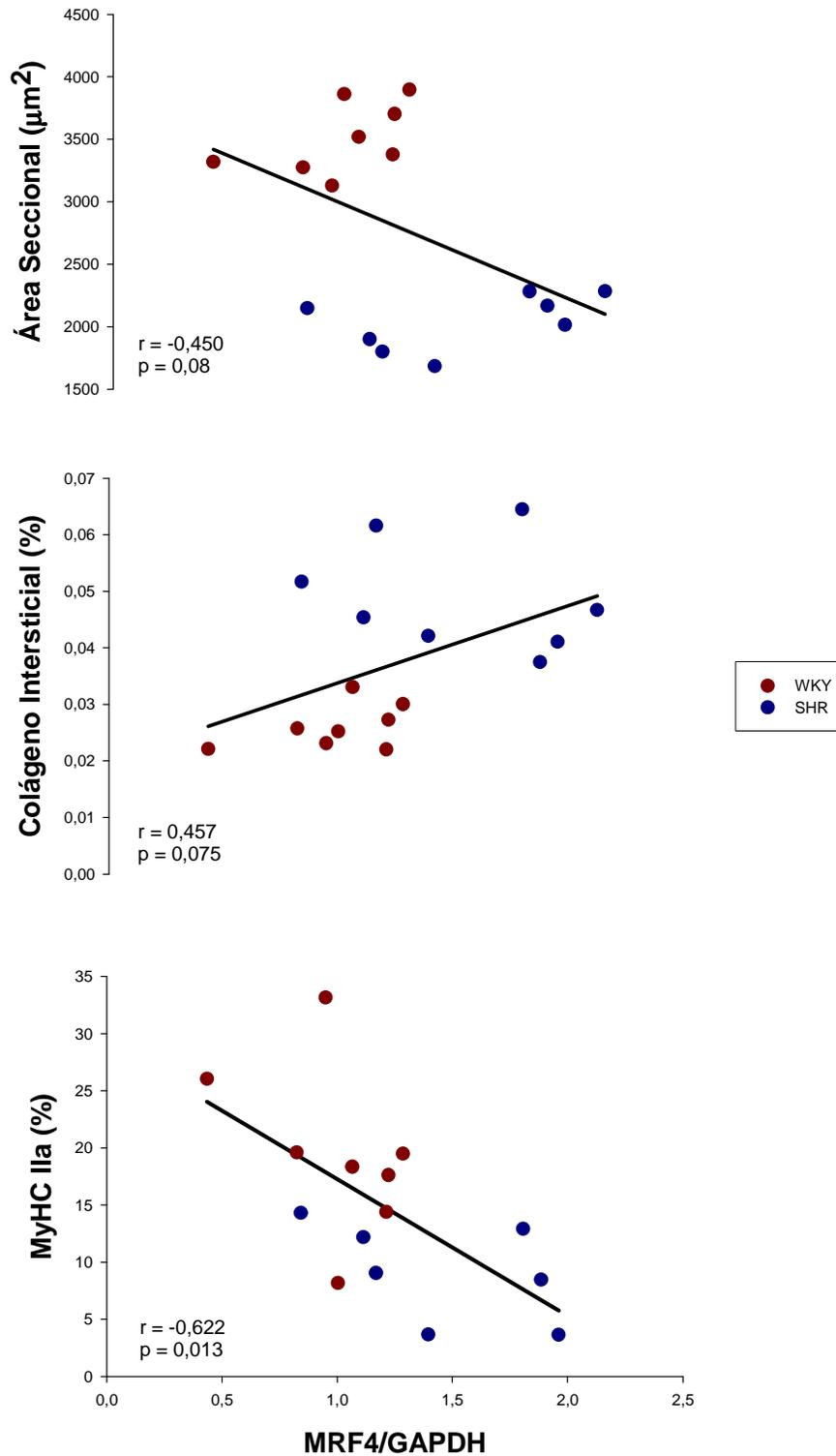
**Figura 15.** Expressão protéica da miostatina no músculo sóleo analisada pela técnica Western blot e normalizada pela expressão protéica do GAPDH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,013$ .



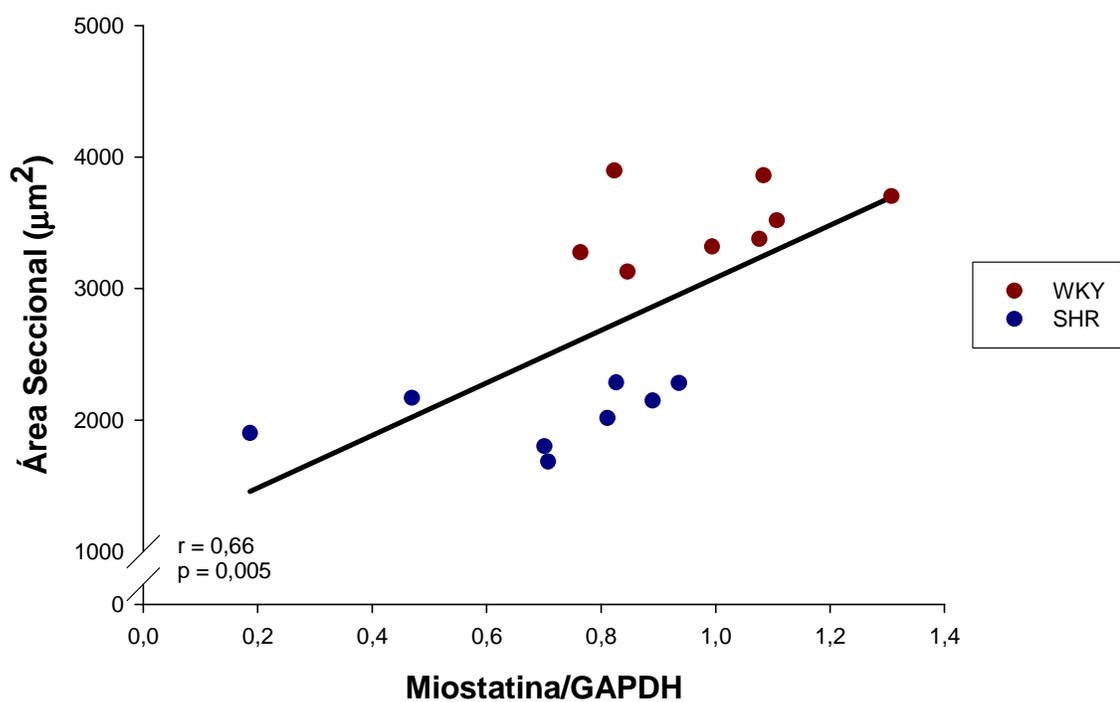
**Figura 16.** Expressão protéica da follistatina no músculo sóleo analisada pela técnica Western blot e normalizada pela expressão protéica do GAPDH. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p = 0,001$ .



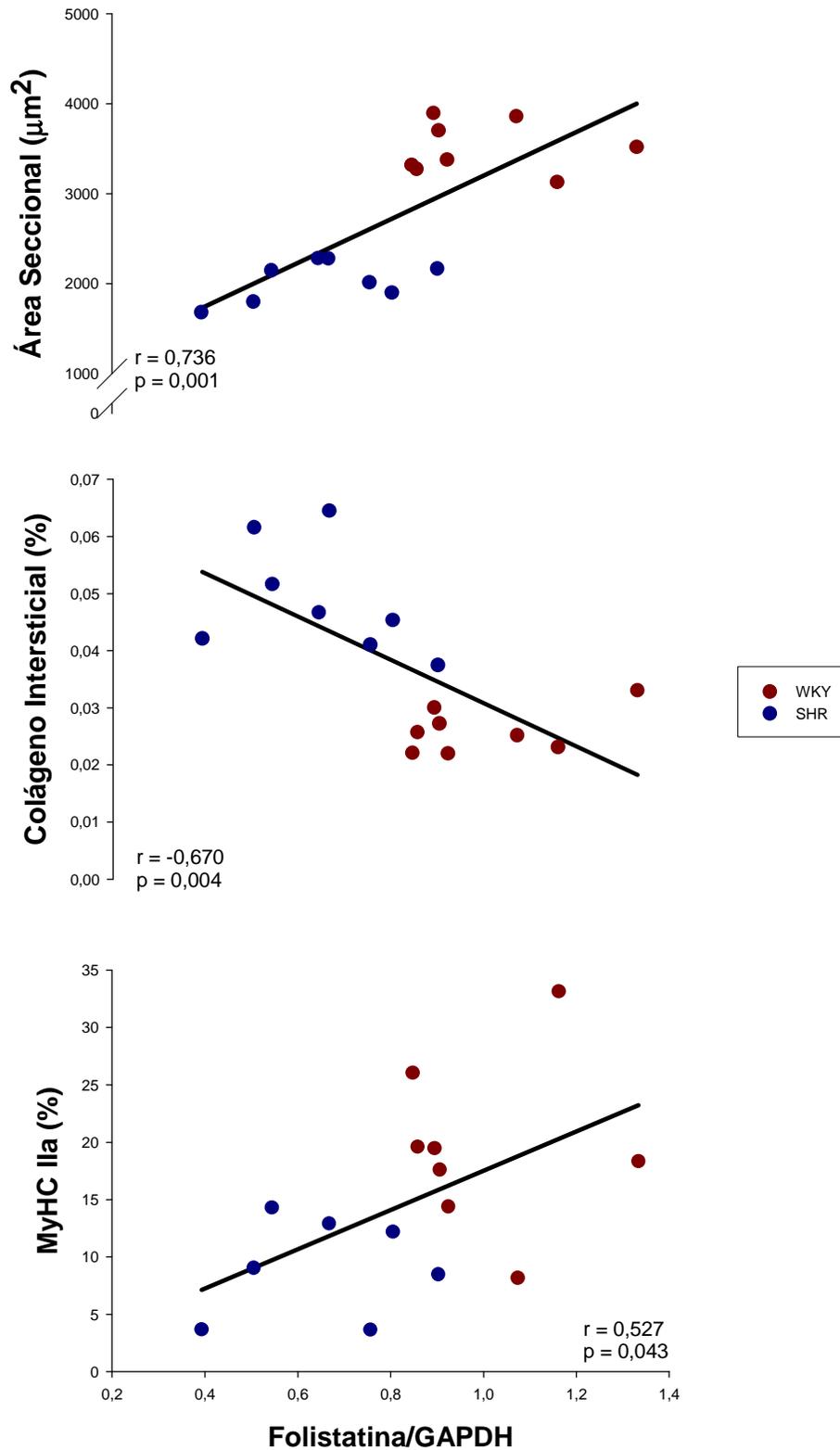
**Figura 17.** Diagrama de dispersão entre a expressão protéica da miogenina e a área seccional das fibras, acima, e a porcentagem de colágeno intersticial, abaixo; correlação de Pearson.



**Figura 18.** Diagrama de dispersão entre a expressão protéica do MRF4 e a área seccional das fibras, acima, a porcentagem de colágeno intersticial, no centro, e a isoforma IIa das cadeias pesadas de miosina (MyHC), abaixo; correlação de Pearson.



**Figura 19.** Diagrama de dispersão entre a expressão protéica da miostatina e a área seccional das fibras; correlação de Pearson.



**Figura 20.** Diagrama de dispersão entre a expressão protéica da folistatina e a área seccional das fibras, acima, a porcentagem de colágeno intersticial, ao centro, e a isoforma IIa das cadeias pesadas de miosina (MyHC), abaixo; correlação de Pearson.

**Discussão**

Neste estudo avaliamos, pela primeira vez, aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares do músculo esquelético sóleo de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca.

Os ratos espontaneamente hipertensos foram introduzidos por Okamoto e Aoki <sup>51</sup> como modelo genético de hipertensão arterial sistêmica. Nestes animais, a história natural da doença é semelhante à que se observa em pacientes com hipertensão arterial não tratada <sup>51,55</sup>. Hipertensão arterial persistente se desenvolve nos SHR a partir de aproximadamente um mês de idade e hipertrofia ventricular esquerda pode ser detectada a partir de três meses de idade <sup>52</sup>. A seguir, ocorre período relativamente longo de hipertrofia compensada, sem insuficiência cardíaca. Após os 12 meses de idade, pode-se detectar disfunção diastólica do ventrículo esquerdo à ecocardiografia <sup>66</sup>. Somente a partir de 18 meses de idade, os animais começam a desenvolver evidências clínicas de insuficiência cardíaca, evoluindo, então, rapidamente para óbito, em geral dentro de duas a três semanas <sup>54</sup>. O padrão de evolução insidiosa da doença, desde a hipertensão arterial não complicada até a fase de insuficiência cardíaca, faz com que o rato espontaneamente hipertenso seja considerado um bom modelo experimental para estudos relacionados ao desenvolvimento crônico de hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca <sup>67</sup>.

Neste estudo, o diagnóstico de insuficiência cardíaca foi baseado em sinais clínicos avaliados *in vivo* como taquipnéia/dispnéia, apatia ou perda de peso. Os ratos do grupo SHR apresentaram taquipnéia/dispnéia e peso corporal estatisticamente menor que o grupo WKY. Em humanos, a redução do peso corporal que acompanha o desenvolvimento de insuficiência cardíaca grave é denominada caquexia cardíaca e constitui importante preditor de mortalidade <sup>68,69</sup>. No momento da eutanásia, o diagnóstico de insuficiência cardíaca foi confirmado por achados anátomo-patológicos avaliados *post mortem* como ascite, derrame pleuropericárdico, congestão hepática, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar <sup>54-57,70,71</sup>. De acordo com estudos realizados em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca, a hipertrofia do ventrículo direito, definida pelo encontro de relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/g, é a melhor variável

para selecionar animais com insuficiência cardíaca <sup>55,72-74</sup>. Em nosso estudo, todos animais do grupo SHR tiveram hipertrofia do ventrículo direito. Mais recentemente, foi apontado que o grau de congestão pulmonar, quando determinado levando em conta o peso total dos pulmões, também é importante para o diagnóstico de insuficiência cardíaca em ratos <sup>57</sup>. Insuficiência cardíaca pode ser diagnosticada quando o peso dos pulmões, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, é maior que a média acrescida de dois desvios padrão dos valores obtidos em grupo controle <sup>57</sup>. Neste estudo, congestão pulmonar esteve presente em sete dos oito animais do grupo SHR. Finalmente, a relação entre o peso úmido e o peso seco do fígado, aumentada nos SHRs, mostra a presença de congestão sistêmica.

Embora o diagnóstico de insuficiência cardíaca tenha sido feito por evidências clínicas e anátomo-patológicas, ecocardiograma transtorácico foi realizado para caracterizar a presença de disfunção ventricular nos SHR. O grupo SHR apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas, evidenciadas pelo aumento da relação diâmetro diastólico do VE/peso corporal e do diâmetro do átrio esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal. Como esperado, o grupo SHR teve aumento da espessura diastólica da parede posterior e do septo interventricular e do peso do VE, este avaliado *post mortem*. Funcionalmente, o grupo SHR apresentou disfunção sistólica e diastólica do VE, caracterizadas pela redução da porcentagem de encurtamento endocárdico e aumento de tempo de relaxamento isovolumétrico, respectivamente.

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo sóleo porque estudos prévios de nosso grupo mostraram que este músculo é sensível às alterações induzidas pela insuficiência cardíaca aguda <sup>41</sup> ou crônica <sup>11,75</sup>. Na avaliação morfológica, observamos importante atrofia muscular no grupo SHR. A média da área seccional das fibras foi 43,7 % menor nos SHR que no grupo WKY. Em trabalhos experimentais com insuficiência cardíaca, foram descritas menores reduções da área seccional ou do diâmetro das fibras musculares. Em nosso laboratório, observamos diminuição da área das fibras de 16,5% <sup>11</sup> e de 9,7 a 12,8% <sup>15,76</sup> em insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica ou por infarto do miocárdio, respectivamente. Em insuficiência cardíaca direita

induzida por monocrotalina, a diminuição do diâmetro da fibra foi de 9,7%<sup>41</sup>. O importante grau de atrofia muscular verificado nos SHR faz com que esse modelo seja particularmente útil em estudos para identificação de mecanismos e vias de sinalização intracelular envolvidos na atrofia associada à insuficiência cardíaca crônica. Como mecanismos potencialmente responsáveis pela atrofia muscular, avaliamos os fatores de regulação miogênica e a via miostatina/folistatina, que estão discutidos abaixo. Além da atrofia, o grupo SHR apresentou aumento da porcentagem de colágeno intersticial. Estudos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de fibrose intersticial neste modelo experimental.

Alterações na composição das cadeias pesadas de miosina têm sido freqüentemente observadas na musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca. Neste estudo, observamos redução da isoforma IIa das MyHCs com aumento proporcional da isoforma I nos SHRs em comparação aos ratos WKY. Esse resultado mostra alteração do padrão muscular para fenótipo com fibras de contração lenta e metabolismo predominantemente oxidativo<sup>77</sup>. Resultados semelhantes foram observados por Vescovo et al.<sup>29</sup>, no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina. Esses resultados não são homogêneos na literatura, havendo relatos de preservação da composição das MyHCs durante a insuficiência cardíaca<sup>75,78</sup> ou, mais comumente, de padrão de modificação das MyHCs oposto ao observado em nosso estudo<sup>9,15,79</sup>. A variedade de padrões das isoformas das MyHCs sugere que os mecanismos moleculares envolvidos na modulação das cadeias pesadas de miosina possam diferir de acordo com o modelo de indução de insuficiência cardíaca<sup>15,31,80</sup>.

Neste estudo verificamos se alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica e da via miostatina/folistatina podem estar associadas às modificações do fenótipo muscular na insuficiência cardíaca. Observamos que a expressão da miogenina foi menor nos SHRs, a expressão protéica da MyoD não se alterou entre os grupos, e a expressão protéica do MRF4 foi significativamente maior nos SHRs. Na via miostatina/folistatina, observamos redução da expressão protéica tanto da miostatina quanto da folistatina no grupo SHR.

A miogenina encontra-se mais expressa em músculos com metabolismo predominantemente oxidativo e está envolvida no processo de diferenciação de células satélites e formação de miotubos <sup>81,82</sup>. Em estudos experimentais, foi observado que aumento do estresse oxidativo e da concentração de TNF- $\alpha$ , condições habitualmente presentes na insuficiência cardíaca <sup>1</sup>, pode levar à redução da miogenina <sup>83</sup>. A diminuição da miogenina interfere negativamente na regeneração das fibras podendo, assim, contribuir para a atrofia muscular <sup>83</sup>, que foi importante no grupo SHR. A existência de correlação positiva entre a área seccional das fibras e a expressão de miogenina sugere a participação da miogenina na atrofia. Uma vez que a miogenina é relacionada ao metabolismo predominantemente oxidativo, seria esperado que sua redução levasse à diminuição das isoformas do tipo I das MyHCs. Entretanto, resultado oposto foi observado no grupo SHR. Como avaliamos apenas a proporção de isoformas das MyHCs em relação ao total de MyHCs, não podemos descartar que tenha ocorrido redução da quantidade absoluta da isoforma do tipo I.

A MyoD é predominantemente expressa em músculos glicolíticos e está associada à expressão de proteínas contráteis. Durante a insuficiência cardíaca, há aumento da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e a interleucina-6 <sup>84</sup>. Em trabalhos experimentais, o aumento do TNF- $\alpha$  pode levar à redução da expressão gênica da MyoD por meio de ativação da via NF- $\kappa$ B <sup>85</sup>. Neste estudo, observamos redução estatisticamente apenas da expressão gênica de MyoD no músculo sóleo. Embora a expressão protéica da MyoD tenha sido 11% menor no grupo SHR, este resultado não alcançou diferença estatística. O padrão das isoformas das MyHCs encontrado, de redução das isoformas do tipo II, predominantemente glicolíticas, foi condizente com a redução da expressão gênica da MyoD.

O fator de regulação miogênica MRF4 é predominantemente expresso em fibras lentas, oxidativas, e parece desempenhar papel importante na modulação do trofismo muscular. Em modelos experimentais como atrofia por desuso <sup>86</sup> ou insuficiência cardíaca aguda <sup>41</sup>, a diminuição da expressão gênica do MRF4 foi associada a atrofia de músculos esqueléticos. Neste estudo, o aumento

da expressão protéica do MRF4 pode ter influenciado o aumento da porcentagem de isoformas do tipo I das MyHCs, que são predominantemente oxidativas. Reforçando esse conceito, verificamos correlação negativa entre expressão protéica do MRF4 e porcentagem de MyHC do tipo IIa, o que sugere a participação deste fator na modulação do fenótipo muscular. Por outro lado, o aumento da expressão protéica do MRF4 e a ausência de correlação significativa entre MRF4 e área seccional das fibras musculares sugerem que este fator não participa do processo de atrofia muscular neste modelo experimental.

A miostatina tem sido frequentemente associada à redução da massa muscular em doenças crônicas <sup>87-89</sup>. Estudos experimentais sobre seu papel fisiológico mostraram correlação negativa entre expressão da miostatina e massa muscular <sup>42</sup>. Além disso, a miostatina pode inibir a expressão de fatores regulatórios músculo-específicos, principalmente a MyoD e miogenina <sup>90,91</sup>. A folistatina, por sua vez, pode atuar como potente antagonista da miostatina e modificar sua atividade *in vivo* <sup>47-49</sup>. Em nosso estudo, foi inesperado o encontro de redução da expressão protéica da miostatina no grupo SHR. Na insuficiência cardíaca induzida por infarto, foram descritos tanto aumento da miostatina <sup>50</sup>, como preservação da miostatina associada a redução da folistatina e atrofia muscular <sup>11</sup>. Em nosso estudo, a redução da expressão protéica da folistatina pode ter aumentado a ação da miostatina e, por consequência, induzido tanto a redução da expressão da MyoD e miogenina como a importante atrofia muscular encontrada nos SHR.

Em conclusão, a miopatia associada à insuficiência cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos é caracterizada por importante atrofia muscular, fibrose intersticial e alteração no padrão das isoformas das cadeias pesadas de miosina, com redução das isoformas do tipo II. A expressão protéica reduzida de miogenina, miostatina e folistatina parece ter participação no desenvolvimento de atrofia muscular. A diminuição da expressão gênica de MyoD e o aumento da expressão protéica de MRF4 parecem estar envolvidas na alteração das isoformas das cadeias pesadas de miosina.

## **Referências Bibliográficas**

1. Mann DL. Management of heart failure patients with reduced ejection fraction. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, eds. *Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:611-640.
2. Albanesi Filho FM. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? *Arq Bras Cardiol*. 2005;85:155-156.
3. Coats AJS. The "muscle hypothesis of chronic heart failure". *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:2255-2262.
4. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1938-1947.
5. Harrington D, Anker SD, Coats AJS. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J*. 2001;22:392-399.
6. Clark AL, Swan JW, Laney R, Connelly M, Somerville J, Coats AJ. The role of right and left ventricular function in the ventilatory response to exercise in chronic heart failure. *Circulation*. 1994;89:2062-2069.
7. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation*. 1993;87:470-475.
8. Coats AJ. Origin of symptoms in patients with cachexia with special reference to weakness and shortness of breath. *Int J Cardiol*. 2002;85:133-139.
9. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation*. 2000;102:1847-1853.
10. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure induces atrophy and myogenin downregulation in rat skeletal muscle. *Eur Heart J*. 2009;30:289-290.

11. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path.* 2010;91:54-62.
12. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation.* 1990;81:518-527.
13. Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1758-1764.
14. Simonini A, Chang K, Yue P, Long CS, Massie BM. Expression of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase is reduced in rats with postinfarction heart failure. *Heart.* 1999;81:303-307.
15. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path.* 2003;84:201-206.
16. Schulze PC, Linke A, Schoene N, Winkler SM, Adams V, Conradi S, Busse M, Schuler G, Hambrecht R. Functional and morphological skeletal muscle abnormalities correlate with reduced electromyographic activity in chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prevention Rehab.* 2004;11:155-161.
17. Williams AD, Selig S, Hare DL, Hayes A, Krum H, Patterson J, Geerling RH, Toia D, Carey MF. Reduced exercise tolerance in CHF may be related to factors other than impaired skeletal muscle oxidative capacity. *J Card Fail.* 2004;10:141-148.
18. Dalla Libera L, Ravara B, Volterrani M, Gobbo V, Barbera MD, Angelini A, Betto DD, Germinario E, Vescovo G. Beneficial effects of GH/IGF-I on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C138-C144.

19. Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiol.* 1997;83:1291-1299.
20. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85:1364-1373.
21. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest.* 1999;115:836-847.
22. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G, Ambrosio GB, Vescovo G. Beneficial effects on skeletal muscle of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation.* 2001;103:2195-2200.
23. Adams V, Jiang H, Yu J, Möbius-Winkler S, Fienh E, Linke A, Weigl C, Schuler G, Hambrecht R. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:959-965.
24. Filippatos GS, Kanatselos C, Manolatos DD, Vougas B, Sideris A, Kardara D, Anker SD, Kardaras F, Uhal B. Studies on apoptosis and fibrosis in skeletal musculature: A comparison of heart failure patients with and without cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* 2003;90:107-113.
25. Bernocchi P, Cargnoni A, Vescovo G, Libera LD, Parrinello G, Boraso A, Ceconi C, Ferrari R. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol.* 2003;98:114-123.
26. Schulze PC, Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. *Int J Cardiol.* 2002;85:141-149.
27. Bernocchi P, Ceconi C, Pedersini P, Pasini E, Curello S, Ferrari R. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2263-2273.

28. Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 2006;109:179-187.
29. Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, Dalla Libera L. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res.* 1998;39:233-241.
30. Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, Angelini A, Vescovo G. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF- $\alpha$  and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1871-1878.
31. Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH. Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol.* 2002;87:182-186.
32. Vescovo G, Dalla Libera L, Serafini F, Leprotti C, Facchin L, Volterrani M, Ceconi C, Ambrosio GB. Improved exercise tolerance after losartan and enalapril in heart failure. Correlation with changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition. *Circulation.* 1998;98:1742-1749.
33. Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J, Massie BM. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res.* 1996;79:128-136.
34. Martinez PF, Okoshi K, Carvalho RF, Campos DHS, Damatto RL, Lima ARR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. *Rev Soc Bras Clin Med.* 2007;5:203-210.
35. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2006;33:155-165.
36. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow

- muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*. 1993;118:1137-1147.
37. Hughes SM, Koyshi K, Rudnicki M, Maggs AM. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev*. 1997;61:151-163.
  38. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol*. 1995;73:723-732.
  39. Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*. 1989;58:537-544.
  40. Seward DJ, Haney JC, Rudnick MA, Swoap SJ. bHLH transcription factor MyoD affects pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;85:C408-C413.
  41. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path*. 2006;87:219-225.
  42. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:61-86.
  43. McPherron AC, Lee S-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:12457-12461.
  44. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*. 1999;277:R601-R606.
  45. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee S-J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*. 2002;296:1486-1488.

46. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24:893-899.
47. Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9306-9311.
48. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol*. 2004;270:19-30.
49. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*. 2008;22:477-487.
50. Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, Schuler G. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:342-348.
51. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-293.
52. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci*. 2000;320:244-248.
53. Cezar MDM, Campos DHS, Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Guizoni DM, Costa LCO, Pereira EJ, Bonomo C, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Bloqueio precoce da aldosterona reduz a mortalidade em ratos espontaneamente hipertensos. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93:132.
54. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:60-65.

55. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
56. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, Aragon FF, Jamas E, Okoshi MP. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supralvar. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81:562-568.
57. Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Nortn GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation.* 2001;103:155-160.
58. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 1971;78:957-962.
59. Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, Matsubara BB. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:607-613.
60. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res.* 2002;22:1353-1364.
61. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, Cicogna AC, Campana AO. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H2242-H2246.

62. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-1083.
63. Dubowitz V. *Muscle Biopsy: a Practical Approach*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001;25:402-408.
65. Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell T, Simpson PC, Lorell BH. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail*. 2004;10:511-518.
66. Oliveira Jr SA, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DHS, Martinez PF, Okoshi MP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Cicogna AC. Perfil nutricional e cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos sob dieta hiperlipídica. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93:526-533.
67. Cicogna AC, Padovani CR, Rosa GJ, Okoshi K, Okoshi MP. Myocardial function in the spontaneously hypertensive rat with food restriction. *J Heart Failure*. 1996;3:171.
68. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, Harrington D, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Wasting as independent risk factor of mortality in chronic heart failure. *Lancet*. 1997;349:1050-1053.
69. Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med*. 2001;58:742-749.
70. Brooks WW, Bing OHL, Conrad CH, O'Neill L, Crow MT, Lakatta EG, Dostal DE, Baker KM, Boluyt MO. Captopril modifies gene expression in hypertrophied and failing hearts of aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1362-1368.

71. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 1995;91:161-170.
72. Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res*. 1991;68:1390-1400.
73. Brooks WW, Healey N, Sen S, Conrad CH, Bing OHL. Oxygen cost of stress development in hypertrophied and failing hearts from the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1993;21:56-64.
74. Cicogna AC, Brooks WW, Hayes JA, Robinson KG, Sen S, Conrad CH, Bing OHL. Effect of chronic colchicine administration on the myocardium of the aging spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem*. 1997;166:45-54.
75. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and increased MyoD gene expression. *Muscle Nerve*. 2010;Submitted.
76. Santos DP, Okoshi K, Moreira VO, Seiva FRF, Almeida FLA, Padovani CR, Carvalho RF, Okoshi MP, Cicogna AC, Castro AVB, Dal Pai-Silva M. Growth hormone attenuates skeletal muscle changes in experimental chronic heart failure. *Growth Horm IGF Res*. 2010;in press.
77. Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M, Samarel AM. Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1683-1691.
78. Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecarpentier Y. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1009-H1017.

79. Dalla Libera L, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB, Vescovo G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1999;277:C982-C986.
80. Martinez PF. Expressão dos fatores de regulação miogênica, composição das miosinas e trofismo no músculo esquelético periférico de ratos com insuficiência cardíaca crônica. In: *Curso de Pós-Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica*; 2008:71 p.
81. Hughes SM, Chi MM-Y, Lowry OH, Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol*. 1999;145:633-642.
82. Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, Gundersen K. Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol*. 2003;548:259-269.
83. Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J*. 2001;15:1169-1180.
84. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990;323:236-241.
85. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang C-Y, Baldwin Jr. AS. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289:2363-2366.
86. Loughna PT, Brownson C. Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats. *FEBS Letter*. 1996;390:304-306.
87. Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *Lancet Oncol*. 2000;1:138-147.

88. Baumann AP, Ibebunjo C, Grasser WA, Paralkar VM. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003;3:8-16.
89. Jespersen J, Kjaer M, Schjerling P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16:74-82.
90. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* 2002;277:49831-49840.
91. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through a NF- $\kappa$ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209:501-514.