

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo será disponibilizado somente a partir de 14/08/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

David Rafael Abreu Reyes

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA N-
ACETILCISTEÍNA NO REMODELAMENTO CARDÍACO E
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS COM
SOBRECARGA PRESSÓRICA CRÔNICA**

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

Orientadora: Prof^a. Adj. Dra. Marina Politi Okoshi
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Damatto
Profa. Dra. Camila Moreno Rosa

**Botucatu
(2017)**

David Rafael Abreu Reyes

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA N-
ACETILCISTEÍNA NO REMODELAMENTO CARDÍACO
E ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS COM
SOBRECARGA PRESSÓRICA CRÔNICA**

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

Orientadora: Prof^a. Adj. *Marina P Okoshi*

Co-orientadores: Prof. Dr. *Ricardo Luiz Damatto*

Profa. Dra. *Camila Moreno Rosa*

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Reyes, David Rafael Abreu.

Influência do exercício físico e da N-Acetilcisteína no remodelamento cardíaco e estresse oxidativo de ratos com sobrecarga pressórica crônica / David Rafael Abreu Reyes. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Adjunta Marina Politi Okoshi
Coorientador: Ricardo Luiz Damatto
Coorientador: Camila Moreno Rosa
Capes: 40101002

1. Remodelação ventricular. 2. Stress oxidativo.
3. Estenose da válvula aórtica. 4. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Estenose aórtica; Estresse oxidativo; Exercício; N-Acetilcisteína; Remodelação cardíaca.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por abençoar minha vida com pessoas maravilhosas e por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais, DAVID e MARISA, ESPOSA e FILHO, meus exemplos, por serem inspiração em minha vida, sempre me apoiarem em todas as decisões, mesmo que elas pudessem nos distanciar, por não medirem esforços para me verem feliz. A todos da minha família, pelos conselhos e ensinamentos, pelo afeto, alegria e apoio.

À Profa. Adjunto MARINA pela confiança, apoio incondicional, exemplo de pesquisadora e profissional excelente.

Ao Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, pela realização da avaliação ecocardiográfica de todos os animais.

À Profa. Dra. ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES, pela análise das enzimas antioxidantes, realizada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Ao amigo DIJON CAMPOS, pela cirurgia para indução de estenose aórtica nos animais e pela amizade.

A todos os colegas da Unipex, MARIANA, CAMILA ROSA, CAMILA GARCIA, FELIPE, MARCELO, LUANA, RICARDO, EDER, TIERRES, ADRIANA, PAULA GRIPPA, DIEGO, DANILO, DE LALLA, IGOR, LUCAS, REGINA, RENATA, ROGÉRIO, SUELI, CRISTIANE, MARA, JOSÉ CARLOS GEORGETE, MARTA, PAULINHO, VÍTOR, GUIOMAR, LEANDRO, MARCIA, SILVIA, CRISTIANE, SARA, pela colaboração para realização deste trabalho,

A TODOS MEUS AMIGOS CUBANOS por seu apoio nos momentos difíceis, a Cris, Artur, Suelen,

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, ANA MARIA MENGUE, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO AUGUSTO, BRUNO JOSÉ FAIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, pela dedicação e simpatia com que sempre me ajudaram,

Aos Funcionários da Seção de Pós Graduação, VANIA SOLER, DIEGO, JANETTE, SERGIO, pela disponibilidade e eficiência para resolver problemas.

À apoio de FAPESP, CNPQ e AUIP/PAEDEX.

A TODAS AS PESSOAS que fizeram parte da minha vida, contribuindo para minha formação profissional e pessoal.

Muito obrigado!

SUMMARY

Introdução	1
N-acetylcysteine influence on oxidative stress and cardiac remodeling in rats during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure	11
Abstract	12
Introduction.....	14
Materials and Methods	16
Results	23
Discussion	34
References	39
Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats	45
Introduction.....	46
Materials and Methods	49
Results	56
Discussion	69
References	74

INTRODUÇÃO

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. A IC pode ser definida como síndrome clínica complexa que resulta de anormalidades cardíacas estruturais e/ou funcionais, adquiridas ou hereditárias, que comprometem a capacidade de enchimento e ejeção ventricular [1].

Aproximadamente 5,1 milhões de americanos têm IC, e a cada ano 550.000 novos casos são diagnosticados nos Estados Unidos. As causas mais comuns são a hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana, miocardiopatias e doença valvar [2]. Apesar do avanço considerável em seu tratamento, principalmente nas últimas décadas, a mortalidade por IC continua elevada. Em pacientes em classes funcionais II e III, recebendo tratamento otimizado, inclusive ressinchronizador e desfibrilador implantável, a mortalidade por IC ainda é de aproximadamente 30 % em seis anos [3]. O mau prognóstico da doença mostra que mecanismos fisiopatológicos importantes ainda permanecem inalterados pelas modalidades terapêuticas atuais.

Independentemente da etiologia da IC, após a agressão cardíaca inicial, ocorrem alterações gênicas, moleculares, celulares, intersticiais e funcionais, que manifestam-se, clinicamente, como modificações no tamanho, forma e função do coração. Este processo é denominado remodelação cardíaca [4].

Atualmente, há substancial evidência que aumento do estresse oxidativo tenha papel importante na fisiopatologia da remodelação cardíaca e no desenvolvimento da IC [5]. O estresse oxidativo ocorre quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) supera a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante. No miocárdio, o sistema de enzimas antioxidantes, composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Cat), protege as células das ações das EROs. Na IC, observa-se aumento do estresse oxidativo tanto em nível sistêmico, como no miocárdio. Potencialmente importantes fontes de EROs na IC incluem a cadeia mitocondrial de transferência de elétrons, a xantina oxidase (XO), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), e NADPH oxidases [6].

No miocárdio insuficiente, a produção de EROs é aumentada na mitocôndria. Aumento crônico na produção de EROs mitocondrial gera declínio funcional da atividade mitocondrial, geração de mais EROs, e lesão celular. As EROs prejudicam diretamente a função contrátil, modificando a atividade de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração. Além disso, as EROs ativam fatores de transcrição e vias intracelulares envolvidas na indução de apoptose. Adicionalmente, as EROs estimulam a proliferação de fibroblastos cardíacos e ativam metaloproteinases da matriz. Os eventos celulares acima descritos estão envolvidos na disfunção do miócito e no desenvolvimento e progressão da remodelação do miocárdio e da matriz extracelular.

Uma importante fonte produtora de estresse oxidativo no coração é a família da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase. Ela foi inicialmente descoberta em fagócitos, com a caracterização da isoforma NOX2, também referida como gp91phox. Mais recentemente, seis outros membros da família codificados por genes distintos foram identificados: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, dupla oxidase DUOX1 e DUOX2. As isoformas predominantemente expressas nos cardiomiócitos são a NOX2 e NOX4 [5] [6]. Estas isoformas diferem entre si quanto ao modo de ativação, à interação com a pequena proteína transmembrana p22phox e à necessidade adicional de fatores de maturação e ativação. A NOX2 forma um complexo com a p22phox, cuja ativação depende da ligação com as subunidades regulatórias citosólicas, p47phox e p67phox. Diferentemente das outras isoformas, a NOX4 é constitutivamente ativa e independente de proteínas citosólicas regulatórias ou ativadoras. A função das enzimas NADPH oxidase é catalisar a transferência de um elétron da NADPH para o oxigênio molecular, gerando EROs [7].

Em condições fisiológicas, a NADPH oxidase é quiescente. Entretanto, quando se torna ativada durante a contração muscular ou por estímulos infecciosos e pró-inflamatórios, a NADPH oxidase pode gerar grandes quantidades do ânion radical superóxido, que pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima antioxidante superóxido dismutase [8]. A atividade da NADPH-oxidase pode ser exacerbada por vários estímulos geralmente presentes durante a IC como, por exemplo, estiramento mecânico do miócito, angiotensina II e

endotelina-1 [6] [8]. Estudos experimentais mostraram que a NOX4, localizada principalmente na mitocôndria de miócitos cardíacos, é responsável pela maior produção de EROs em situação de sobrecarga de pressão e envelhecimento [6] [8].

Aumento da atividade e da expressão da NADPH oxidase foi observado na hipertrofia ventricular esquerda (HVE) por sobrecarga de pressão e no infarto do miocárdio. Aumento do estresse oxidativo tem efeitos diretos sobre as estruturas e função cardíaca. O estresse oxidativo estimula a hipertrofia miocitária e a remodelação da matriz extracelular, e induz disfunção celular.

Quanto às vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva a alterações miocárdicas, há evidências que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) possam estar envolvidas [9]. As proteínas da via das MAPKs como a ERK1/2, JNK e p38 MAPK estão envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia miocárdica e de IC [10]. As EROs podem, também, ativar as metaloproteases (MMP), uma família de enzimas proteolíticas, e induzir alterações da matriz extracelular [6].

O exercício físico tem sido considerado importante estratégia terapêutica não farmacológica na prevenção e reabilitação de muitas doenças cardiovasculares incluindo a IC crônica [11]. De acordo com a III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca, exercícios físicos devem ser prescritos para pacientes com IC estável que sejam capazes de participar de programa de treinamento físico [12].

Os efeitos benéficos do treinamento físico no sistema cardiovascular estão associados a redução de ativação neuro-humoral e inflamatória sistêmica e melhora da função vascular. O exercício físico pode afetar positivamente o consumo máximo de oxigênio, a capacidade física, e a função cardíaca e autonômica do sistema nervoso, muscular esquelética e vascular periférica [11]. Embora sejam evidentes os benefícios do exercício, ainda não estão completamente identificados os mecanismos moleculares pelos quais o treinamento físico melhora a função ventricular durante a IC.

Entre os efeitos benéficos do exercício físico, destaca-se sua ação antioxidante. O exercício aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e reduz a expressão de enzimas pró-oxidantes. O aumento na atividade de enzimas antioxidantes pode ser observado em vários tecidos, após treinamento aeróbio ou

anaeróbico [13] [14]. Os radicais livres produzidos durante a contração muscular atuam como moléculas de sinalização, estimulando a expressão gênica e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes. Adicionalmente, modulam vias de proteção ao estresse oxidativo promovendo, por exemplo, aumento de enzimas reparadoras do DNA nos miocárdio [15] [16] [17] [18].

Estudos experimentais mostraram que o treinamento físico aumenta a capacidade antioxidante do miocárdio e a expressão de proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio tanto em animais saudáveis como naqueles com IC. Em vários estudos, foi observada a contribuição do treinamento físico para a melhora da expressão de marcadores da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo no miocárdio [19] [20].

É importante salientar que a maioria dos estudos sobre os efeitos benéficos do exercício na IC foram realizados em modelos experimentais de isquemia miocárdica. Poucos trabalhos avaliaram os efeitos do exercício durante a sobrecarga pressórica crônica e sua transição para IC descompensada, condição de alta prevalência devida à elevada frequência de hipertensão arterial sistêmica e cardiopatia hipertensiva na população geral, e de estenose aórtica em idosos.

Apesar da importância do estresse oxidativo na indução de dano miocárdico, a terapia antioxidante ainda é assunto controverso no tratamento da IC [21] [22]. (A glutathione (L- γ glutamil-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo endógeno que apresenta papel central na defesa celular contra o estresse oxidativo [23] A glutathione é sintetizada e mantida em elevadas concentrações nas células em geral [24] Na IC, ocorre alteração do estado redox da glutathione e sua concentração é reduzida no miocárdio [25] [26].

A N-acetilcisteína (NAC) é uma molécula com propriedades antioxidantes, que possui um grupo sulfidril que age como fonte de cisteína para a síntese de glutathione. A administração de NAC resultou em restauração da concentração total de glutathione miocárdica e redução de marcadores do estresse oxidativo, como hidróperóxido de lipídeo e peróxido de hidrogênio, em ratos infartados [23] [25] [27].

Adicionalmente, a NAC atenuou hipertrofia cardíaca e miocitária, fibrose intersticial, disfunção ventricular, e propensão a arritmias em diferentes modelos de injúria cardíaca [26] [28] [29] [30].

Entretanto, os efeitos da NAC durante a transição de hipertrofia ventricular compensada para a IC clínica não foram avaliados.

Estenose aórtica ascendente em ratos jovens tem sido considerada bom modelo para estudo experimental da hipertrofia cardíaca e IC [31] [32] [33] [34]. Neste modelo, um clip de prata não obstrutivo é colocado ao redor da aorta ascendente. À medida que os animais crescem, passam a manifestar a estenose aórtica e a desenvolver hipertrofia ventricular esquerda concêntrica e disfunção diastólica. Mais tardiamente, ocorrem redução do desempenho ventricular sistólico e IC[32] [33].

Objetivo

Avaliar, isoladamente, a influência do exercício físico aeróbio e da administração de N-acetilcisteína sobre a função ventricular, o estresse oxidativo miocárdico e as vias de sinalização das MAPK em ratos com estenose aórtica durante a transição de sobrecarga pressórica crônica para insuficiência cardíaca clínica.

A seguir, apresentaremos os dois manuscritos que foram derivados deste estudo.

Referências

1. Greenberg B, Kahn A: Braunwald's Heart Disease A textbook of cardiovascular medicine; in Bonow R, Mann D, Zipes D, Libby (eds): Braunwald's Heart Disease A textbook of cardiovascular medicine, 9th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012, pp 505-516.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al.: Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 2016;133:e38-e360.
3. Khidir MJH, Delgado V, Ajmone Marsan N, Schalij MJ, Bax JJ: QRS duration versus morphology and survival after cardiac resynchronization therapy. *ESC Hear Fail* 2017;4:23-30.
4. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N: Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.
5. Theccanat T, Philip JL, Razzaque AM, Ludmer N, Li J, Xu X, et al.: Regulation of cellular oxidative stress and apoptosis by G protein-coupled receptor kinase-2; The role of NADPH oxidase 4. *Cell Signal* 2016;28:190-203.
6. Matsushima S, Kuroda J, Zhai P, Liu T, Ikeda S, Nagarajan N, et al.: Tyrosine kinase FYN negatively regulates NOX4 in cardiac remodeling. *J Clin Invest* 2016;126:3403-16.
7. Sirker A, Murdoch CE, Protti A, Sawyer GJ, Santos CXC, Martin D, et al.: Cell-specific effects of Nox2 on the acute and chronic response to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2016;98:11-7.
8. Sag CM, Santos CXC, Shah AM: Redox regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2014;73:103-11.

9. Byun M-S, Jeon K-I, Choi J-W, Shim J-Y, Jue D-M, Lee S-S, et al.: Dual effect of oxidative stress on NF-kappaB activation in HeLa cells. *Exp Mol Med* 2002;34:332-9.
10. Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell TD, et al.: Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail* 2004;10:511-8.
11. Alves AJ, Viana JL, Cavalcante SL, Oliveira NL, Duarte JA, Mota J, et al.: Physical activity in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Overview updated. *World J Cardiol* 2016;8:575-583.
12. Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues D de A, et al.: [Updating of the Brazilian guideline for chronic heart failure - 2012]. *Arq Bras Cardiol* 2012;98:1-33.
13. Margaritelis N V, Theodorou AA, Paschalis V, Veskoukis AS, Dipla K, Zafeiridis A, et al.: Experimental verification of regression to the mean in redox biology: differential responses to exercise. *Free Radic Res* 2016;50:1237-1244.
14. Staiculescu MC, Foote C, Meininger GA, Martinez-Lemus LA: The role of reactive oxygen species in microvascular remodeling. *Int J Mol Sci* 2014;15:23792-835.
15. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J: The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil* 2015;36:377-93.
16. Brown DI, Griendling KK: Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res* 2015;116:531-49.
17. Ennezat P V, Malendowicz SL, Testa M, Colombo PC, Cohen-Solal A, Evans T, et al.: Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:194-8.
18. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, et al.: Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget* 2017;8:20428-20440.

19. Ping Z, Zhang L, Cui Y, Chang Y, Jiang C, Meng Z, et al.: The Protective Effects of Salidroside from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 α -NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:876825.
20. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, et al.: Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2709-15.
21. Münzel T, Gori T, Keaney JF, Maack C, Daiber A: Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J* 2015;36:2555-64.
22. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW: Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:406-27.
23. Fratelli M, Goodwin LO, Ørom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M, et al.: Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13998-4003.
24. Rushworth GF, Megson IL: Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014;141:150-9.
25. Adamy C, Mulder P, Khouzami L, Andrieu-abadie N, Defer N, Candiani G, et al.: Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:344-53.
26. Lombardi R, Rodriguez G, Chen SN, Ripplinger CM, Li W, Chen J, et al.: Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms. *Circulation* 2009;119:1398-407.
27. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin M-C, Badoual T, et al.: N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha

level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats. *Circulation* 2004;110:2003-9.

28. Giam B, Chu P-Y, Kuruppu S, Smith AI, Horlock D, Kiriazis H, et al.: N-acetylcysteine attenuates the development of cardiac fibrosis and remodeling in a mouse model of heart failure. *Physiol Rep* 2016;4:e12757.
29. Wilder T, Ryba DM, Wieczorek DF, Wolska BM, Solaro RJ: N-acetylcysteine reverses diastolic dysfunction and hypertrophy in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;309:H1720-30.
30. Foltz WU, Wagner M, Rudakova E, Volk T: N-acetylcysteine prevents electrical remodeling and attenuates cellular hypertrophy in epicardial myocytes of rats with ascending aortic stenosis. *Basic Res Cardiol* 2012;107:290.
31. Weinberg EO, Lee MA, Weigner M, Lindpaintner K, Bishop SP, Benedict CR, et al.: Angiotensin AT1 receptor inhibition. Effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1997;95:1592-600.
32. Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, et al.: Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supra-aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol* 2003;81:569-75, 562-8.
33. Moreira VO, de Castro AVB, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, et al.: [Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats]. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:432-8.
34. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, et al.: Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:325-30.