

Ricardo Luiz Damatto

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a expressão da miostatina e o trofismo de músculos esqueléticos e cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. *Marina Politi Okoshi*

**Botucatu - SP
2014**

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

Damatto, Ricardo Luiz.

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a expressão da miostatina e o trofismo de músculos esqueléticos e cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca / Ricardo Luiz Damatto. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi

Capes: 40101002

1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos. 2. Sistema musculoesquelético. 3. Folistatina. 4. Miostatina. 5. Atrofia muscular. 6. Insuficiência cardíaca. 7. Rato como animal de laboratório. 8. Hipertensão.

Palavras-chave: Exercício físico; Folistatina; Miostatina; Rato espontaneamente hipertenso.

Dedicatória

Aos meus pais, ERVAL RAFAEL DAMATTO e JACIRA ROSSINI DAMATTO, que sempre estiveram comigo a cada passo, oferecendo compreensão, motivação e encorajamento.

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

À minha companheira, PRISCILA por acreditar em mim e me ajudar a superar todas dificuldades. Obrigado pelo seu amor, carinho, companheirismo, ensinamentos e paciência. Obrigado por me tornar uma pessoa melhor.

Agradecimentos

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

À Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela orientação, paciência, ensino e responsável pelo meu crescimento pessoal e profissional! A senhora, minha eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. LUIS CUADRADO MARTIN e a Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO, pela amizade, atenção e valiosas sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos meus amigos: ALINE, ANDRÉA, CAMILA BONOMO, DANIELE, DIJON, LUANA, MARCELO, MARIA TERESA, MARIANA, PAULA, SANDRO e SILVIO pelos inúmeros momentos de alegria!

Aos meus companheiros nesta jornada: BRUNA, CAMILA ROSA, FABIANE, GABRIEL, REGIANE e RODRIGO que compartilharam das mesmas dificuldades e expectativas!

Aos ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA pelo convívio e parceria nos trabalhos.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: ALEXANDRE LUÍS LOUREIRO, ANA MARIA MENGUE, BRUNO JOSÉ FAJIOOLI, 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, 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 CICOGLA, Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, Prof. Dr. LEONARDO ZORNOFF, Prof. Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI, Prof^a. Dra. PAULA SCHIMDT, Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO, Prof. Dr. MARIO MATHEUS SUGIZAKI e Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI pela amizade e pronta colaboração profissional.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP, Proc. n. 2009/54857-4 e 2012/50512-5), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	4
1. Introdução	7
2. Objetivos.....	13
3. Material e Métodos	15
4. Resultados	24
5. Discussão	49
6. Conclusões.....	57
7. Referências Bibliográficas	59

RESUMO

A insuficiência cardíaca caracteriza-se por redução da tolerância aos esforços físicos com ocorrência precoce de fadiga e dispneia. Além de disfunção cardíaca e pulmonar, anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética têm sido responsabilizadas pela redução da capacidade física. Uma das alterações mais comumente encontrada é a atrofia de músculos esqueléticos. A via miostatina/folistatina tem importante papel na manutenção do trofismo muscular, havendo correlação negativa entre a miostatina e a massa muscular. No miocárdio, a expressão da miostatina aumenta durante sobrecarga hemodinâmica crônica e pode contribuir para a redução da massa muscular periférica. O exercício físico tem papel importante no tratamento da insuficiência cardíaca. Entretanto, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos pelos quais o exercício modula a capacidade funcional na insuficiência cardíaca. Neste trabalho, testamos a hipótese que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com insuficiência cardíaca apresentam alteração na via miostatina/folistatina em músculos esqueléticos e cardíaco, e que esta pode ser modulada pelo treinamento físico prolongado. Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar se atrofia da musculatura esquelética de SHR com insuficiência cardíaca está associada a alteração na via de sinalização intracelular miostatina/folistatina; 2) determinar se o treinamento físico aeróbio prolongado atenua o processo de atrofia e se modula a expressão das proteínas miostatina/folistatina nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio; e 3) avaliar a via miostatina/folistatina no miocárdio e determinar se o treinamento atenua a remodelação cardíaca e possíveis alterações desta via. **Métodos:** Ratos machos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e SHR com 16 meses de idade foram divididos em quatro grupos: 1) controle (WKY-Sed, n=20); 2) controle exercitado (WKY-Ex, n=20); 3) insuficiência cardíaca (SHR-Sed, n=25); e 4) insuficiência cardíaca exercitado (SHR-Ex, n=25). Os grupos exercitados foram treinados em esteira cinco dias por semana durante quatro meses. Avaliação cardíaca foi realizada no início e final do período experimental por ecocardiograma. Morfometria dos músculos esqueléticos e do miocárdio foi avaliada em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. A expressão gênica e proteica da miostatina e folistatina foi avaliada por PCR em tempo real e Western blot, respectivamente. A análise

estatística foi realizada por ANOVA para o esquema fatorial 2 X 2, complementada com o teste de Tukey, ou teste de Mann-Witney (valor de $p < 0,05$). A frequência de sinais de insuficiência cardíaca foi avaliada pelo teste de Goodman. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** A capacidade funcional foi superior nos grupos SHR que nos WKY e melhor nos ratos treinados que nos sedentários. O grupo SHR-Ex apresentou menor frequência de sinais de insuficiência cardíaca que o SHR-Sed. Antes do treinamento, os grupos SHR foram semelhantes entre si e apresentaram hipertrofia ventricular esquerda concêntrica e disfunção diastólica em relação aos WKY. No final do experimento, os SHR também apresentaram disfunção sistólica; o treinamento não alterou as variáveis ecocardiográficas nos SHR. O exercício físico atenuou a hipertrofia miocitária nos SHR. A expressão gênica da folistatina e proteica da miostatina foi maior no miocárdio dos SHR que nos WKY e não foi alterada pelo treinamento. A área seccional das fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmio foi menor nos SHR que nos WKY. No sóleo, a expressão proteica da miostatina foi menor nos SHR-Ex que no WKY-Ex. No gastrocnêmio, a expressão gênica da miostatina foi maior no SHR-Sed que no WKY-Sed e no SHR-Ex. **Conclusões:** O treinamento físico aeróbio melhora a capacidade funcional de SHR com insuficiência cardíaca, reduz a frequência de sinais de insuficiência cardíaca, e não altera a expressão proteica de miostatina no miocárdio. Embora não atenua a atrofia dos músculos esqueléticos, o exercício aeróbio reduz a expressão proteica da miostatina no músculo sóleo dos SHR.

ABSTRACT

Heart failure is characterized by a reduced tolerance to physical activity with early development of fatigue and dyspnea. Besides cardiac and pulmonary dysfunction, skeletal muscle abnormalities can also be involved in the reduced physical capacity. Atrophy is a commonly found skeletal muscle alteration. Myostatin/follistatin pathway has an important role in skeletal muscle mass maintenance with myostatin being negatively correlated with muscle mass. In myocardium, myostatin levels increase during chronic overload and can contribute to the decreased peripheral muscle mass. Physical exercise has an important role in heart failure treatment. However, mechanisms involved in exercise-induced improvement of physical capacity are not completely understood. In this study, we hypothesized that spontaneously hypertensive rats (SHR) with heart failure present myostatin/follistatin pathway change in skeletal and cardiac muscle, which can be modulated by prolonged physical training. The aims of this study are: 1) to evaluate whether skeletal muscle atrophy is associated with changes in the myostatin/follistatin intracellular pathway in SHR with heart failure; 2) to determine whether aerobic physical training attenuates muscle atrophy and/or modulates myostatin/follistatin expression in soleus and gastrocnemius muscles; e 3) to evaluate myocardial myostatin/follistatin levels and to determine whether training attenuates cardiac remodeling and possible changes in the myostatin/follistatin pathway. **Methods:** Male sixteen-month-old normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats and SHR were assigned to four groups: 1) control (WKY-Sed, n=20); 2) exercised control (WKY-Ex, n=20); 3) heart failure (SHR-Sed, n=25); and 4) exercised heart failure (SHR-Ex, n=25). Exercised groups were subjected to a treadmill exercise protocol, five days a week, for four months. Transthoracic echocardiogram was performed before and after training. Morphometry was analyzed in hematoxylin and eosin stained histological sections. Gene and protein expression was evaluated by real time PCR and Western blot, respectively. Comparisons between groups were performed using 2x2 factorial analysis of variance (ANOVA), complemented with Tukey multiple comparisons test (normal distribution) or Mann-Whitney test (non normal distribution; 2 x p value). Goodman test was used to analyze heart failure features frequency. Statistical

significance was set 5%. **Results:** Functional capacity was better in SHR thanWKY groups and was improved by training. SHR-Ex group presented a lower frequency of heart failure features than SHR-Sed. Before training, SHR groups were similar and had concentric left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction when compared to the WKY groups. At the end of experiment, SHR groups also had systolic dysfunction; training did not change echocardiographic parameters in the SHR. Physical exercise attenuated myocyte hypertrophy in the SHR. Follistatin gene expression and myostatin protein expression were higher in myocardium from both SHR groups than WKY and were not changed by training. Soleus and gastrocnemius fiber cross sectional area was smaller in SHR than WKY groups. In soleus, myostatin protein levels were lower in SHR-Ex than WKY-Ex. In gastrocnemius, myostatin gene expression. was higher in SHR-Sed than WKY-Sed and SHR-Ex. **Conclusions:** Aerobic physical training improves functional capacity, reduces heart failure features frequency without changing echocardiographic parameters or myocardial myostatin protein levels in SHR with heart failure. In skeletal muscles, training does not prevent atrophy, but reduces myostatin protein expression in soleus muscle of SHR.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca crônica constitui importante problema clínico de saúde devido à gravidade de suas manifestações e à sua grande prevalência. Atualmente, a doença afeta mais de 23 milhões de pessoas em todo o mundo (1). Estatísticas dos Estados Unidos mostram que a prevalência de insuficiência cardíaca é variável de acordo com a idade, acometendo 0,4 a 2% da população total e 6 a 10% das pessoas com mais de 65 anos de idade (2). 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 (3).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica complexa que se origina de anormalidades cardíacas estruturais e/ou funcionais, adquiridas ou hereditárias, que levam a piora da capacidade de enchimento e ejeção ventricular. Suas principais causas são a hipertensão arterial sistêmica, isquemia miocárdica e miocardiopatias (2).

Entre os sintomas mais importantes causados pela insuficiência cardíaca crônica, estão a fadiga e a intolerância aos esforços físicos. Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento desses sintomas vêm sendo estudados nas últimas décadas (4, 5). Inicialmente, considerava-se que a capacidade reduzida para exercícios físicos com a ocorrência prematura de sintomas era causada por diminuição da capacidade funcional do coração e pulmão e pobre perfusão tecidual devido 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 (5, 6). Mais recentemente, foi aventado que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética também pudessem ter papel na redução da capacidade funcional na insuficiência cardíaca (7-9).

A partir de 1990, diversas anormalidades passaram a ser descritas em músculos esqueléticos periféricos e respiratórios durante a insuficiência cardíaca. Atrofia muscular, aumento de fibrose e redução da densidade capilar foram observados em estudos clínicos e experimentais (10-13). Também foram descritas anormalidades metabólicas, enzimáticas e bioquímicas, tais como diminuição da

atividade de enzimas oxidativas como citrato sintase, 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase e citocromo-c oxidase (9, 14-18). Alterações no padrão de composição das fibras musculares esqueléticas têm sido frequentemente encontradas na insuficiência cardíaca (13, 19, 20). Em ratos com estenose aórtica, encontramos alteração da composição das cadeias pesadas de miosina do músculo sóleo, tanto na fase de insuficiência cardíaca estabelecida, como também durante a fase de hipertrofia ventricular compensada (19). Estes resultados sugeriram que o comprometimento da musculatura esquelética possa ser decorrente não somente da piora hemodinâmica característica da insuficiência cardíaca, mas também de anormalidades bioquímicas e/ou neuro-hormonais associadas ao quadro de injúria do coração.

Entre as alterações morfológicas mais frequentemente descritas, encontra-se a atrofia da massa muscular esquelética (13, 17, 19-27). Redução da musculatura esquelética foi observada em 68% dos pacientes com insuficiência cardíaca crônica em tratamento ambulatorial (10), principalmente em músculos dos membros inferiores (28). 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 físicos e atividades cotidianas.

As causas responsáveis pela atrofia muscular associada à insuficiência cardíaca crônica ainda não estão completamente definidas. Alguns fatores têm sido responsabilizados como redução da atividade física e neuromuscular, ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanha o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, redução da síntese protéica e/ou aumento do catabolismo muscular e ocorrência de apoptose e necrose (20, 29-33). Do mesmo modo, não são conhecidos os mecanismos moleculares e as vias sinalizadoras que controlam o trofismo da musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca.

Mais recentemente, foi observado que a via miostatina/folistatina tem importante papel na manutenção do trofismo muscular (34). A miostatina, previamente denominada GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8), foi descoberta em pesquisa para identificar novos membros da super família TGF-beta (fator transformador do crescimento-beta) de fatores de diferenciação e

crescimento celular (35, 36). 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 (36, 37). Camundongos com deleção do gene para miostatina apresentaram aumento da massa muscular decorrente de hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares (35, 36). Adicionalmente, aumento da expressão da miostatina em camundongos adultos resultou em intensa perda corporal de músculo e gordura (38, 39), à semelhança do que ocorre em síndromes de caquexia humana. Reforçando esses dados, a inibição farmacológica da miostatina por anticorpo monoclonal causou hipertrofia, atenuação de fibrose e aumento da força muscular em camundongos adultos ou idosos, na ausência de alterações em órgãos como rins, fígado e coração (40, 41). Em humanos, diferentes inibidores da via miostatina, incluindo anticorpos anti-miostatina, vêm sendo avaliados em estudos clínicos fases I e II para tratamento de distrofia muscular e perda muscular associada a doenças crônicas (41-43).

A ação da miostatina pode ser modulada por várias proteínas. Uma das mais estudadas é a folistatina, que tem a propriedade de unir-se à miostatina e inibir sua habilidade para ligar-se aos receptores celulares (36, 44). Estudos sugerem que a folistatina pode atuar como potente antagonista da miostatina e modificar sua atividade in vivo (44-48).

Na insuficiência cardíaca crônica, há poucos estudos sobre a expressão das proteínas da via miostatina/folistatina em músculos esqueléticos. Em humanos ou ratos com insuficiência cardíaca, foi observado que a expressão da miostatina encontra-se aumentada em músculos esqueléticos (49-52). Por outro lado, verificamos que ratos infartados com insuficiência cardíaca crônica apresentam atrofia do músculo sóleo na ausência de alterações da expressão gênica e proteica da miostatina. Entretanto, também observamos redução da expressão proteica da folistatina (53). Como a folistatina é antagonista da miostatina, sua redução pode ter colaborado para aumentar a atividade da miostatina e induzir atrofia muscular.

A miostatina, embora predominantemente expressa no músculo esquelético, pode também ser encontrada no músculo cardíaco (51, 54, 55). Em situações fisiológicas, a miostatina parece ter pouco ou nenhum efeito sobre as

propriedades moleculares e funcionais do coração (55). Entretanto, parece estar envolvida nas modificações do miocárdio associadas ao processo de remodelação cardíaca. Em situações de sobrecarga hemodinâmica, foi observado aumento da expressão da miostatina no miocárdio, tanto em estudos experimentais como em humanos com insuficiência cardíaca grave (50, 51, 54, 56). No coração, a miostatina tem a ação pro-fibrótica e pode alterar a função cardíaca durante o envelhecimento (55, 57). Estudos in vitro mostram que a miostatina inibe estímulo hipertrófico induzido por adição de fenilefrina ou por estiramento miocárdico (58, 59). Acredita-se que, com o aumento de sua síntese no miocárdio, a miostatina seja liberada na corrente sanguínea e possa ter ação em órgãos à distância (50, 51, 55). Um dos principais alvos da miostatina é a musculatura esquelética, na qual inibe o crescimento muscular (55).

A expressão da miostatina pode ser modulada, não somente pelos seus antagonistas, como também pelo exercício físico. Estudos clínicos e experimentais mostraram que o treinamento físico regular previne aumento na expressão proteica da miostatina em músculos esqueléticos (51, 52) e cardíaco (51). Entretanto, não foram avaliados os efeitos do exercício sobre a interação entre miostatina e trofismo muscular ou grau de hipertrofia ventricular. Atualmente, considera-se que o exercício físico apresenta importante papel no tratamento de doentes com insuficiência cardíaca (60-66), sendo recomendado para pacientes com insuficiência cardíaca estável nos estágios I a III da classificação da New York Heart Association (67, 68).

Um modelo experimental muito utilizado para o estudo da fisiopatologia e tratamento da insuficiência cardíaca é o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Estes animais foram desenvolvidos por Okamoto e Aoki como modelo de hipertensão arterial genética semelhante à que ocorre em humanos (69). Os ratos manifestam hipertensão arterial sistêmica a partir de um mês de idade e, também precocemente, começam a desenvolver hipertrofia do ventrículo esquerdo (70). A seguir, apresentam período relativamente longo de hipertrofia ventricular compensada, no qual a função cardíaca se mantém preservada. A partir de aproximadamente 12 meses de idade, os ratos começam a apresentar evidências de disfunção cardíaca diastólica e, entre 18 e 24 meses, manifestam disfunção

sistólica com quadro clínico e anátomo-patológico de insuficiência cardíaca (71-73). Devido à evolução lenta da fase de hipertrofia ventricular compensada para a fase de insuficiência cardíaca, os ratos espontaneamente hipertensos são considerados bom modelo experimental para mimetizar situações clínicas de insuficiência cardíaca.

Em estudo prévio, observamos que SHR com insuficiência cardíaca apresentam atrofia da musculatura esquelética com aumento do colágeno intersticial e alteração na composição das cadeias pesadas de miosina e na expressão das proteínas miostatina e folistatina (13). Não identificamos na literatura outros relatos sobre as condições dos músculos esqueléticos de SHR com insuficiência cardíaca ou trabalhos avaliando os efeitos do exercício físico sobre a capacidade física, o fenótipo da musculatura esquelética ou a remodelação cardíaca neste modelo experimental.

Neste trabalho testamos a hipótese que ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca apresentam alteração na expressão da via miostatina/folistatina em músculos esqueléticos e cardíaco, e que esta pode ser modulada pelo treinamento físico prolongado.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar se a atrofia da musculatura esquelética de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca está associada a alteração da via de sinalização intracelular miostatina/folistatina.
2. Determinar se o treinamento físico aeróbio prolongado atenua o processo de atrofia e se modula a expressão das proteínas miostatina/folistatina dos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca.
3. Avaliar a via miostatina/folistatina no miocárdio de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca e determinar se o treinamento físico aeróbio atenua o processo de remodelação cardíaca e possíveis alterações da via miostatina/folistatina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar-Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos 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 (21 ± 2 °C) e ciclos invertidos de luminosidade de 12 h. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Foram constituídos quatro grupos experimentais:

- 1) grupo controle (WKY-Sed, n=20), formado por ratos Wistar-Kyoto;
- 2) grupo controle exercitado (WKY-Ex, n=20), formado por ratos Wistar-Kyoto submetidos a protocolo de exercício físico;
- 3) grupo insuficiência cardíaca (SHR-Sed, n=25), formado por SHR com insuficiência cardíaca;
- 4) grupo insuficiência cardíaca exercitado (SHR-Ex, n=25), formado por SHRs com insuficiência cardíaca submetidos a protocolo de exercício.

Protocolo de treinamento físico foi aplicado a partir de 16 meses de idade por período de quatro meses.

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a constituição de grupos experimentais com 12 a 16 animais é adequada para estudos morfológicos e moleculares dos músculos esqueléticos (13, 19, 20, 27, 74) e para avaliação funcional e estrutural do coração (75, 76). Como a mortalidade dos ratos é elevada nessa faixa etária (75), cada grupo experimental normotenso foi composto inicialmente por 20 ratos e o grupo dos animais hipertensos por 25 ratos.

Durante a eutanásia, foram avaliados os seguintes sinais clínico e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca: taquipnéia, derrame pleural, ascite, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito em mg/peso corporal em g > 0,8) e congestão pulmonar (relação

peso dos pulmões/peso corporal > 2 desvios padrão acima da média do grupo Sham) (77).

Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial caudal foi aferida indiretamente na cauda do animal antes e após o período de treinamento físico. Os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40 °C por 5 minutos e as medidas determinadas por plestimografia, utilizando-se esfigmomanômetro (Narco Bio-System®, modelo 709-0610, International Biomedical, Inc, USA).

Estudo ecocardiográfico

As estruturas cardíacas e a função do ventrículo esquerdo (VE) foram avaliadas antes e após o protocolo de exercícios por ecocardiograma transtorácico. Previamente, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intramuscular. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado equipamento da General Electric Medical Systems, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 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 (75-77). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE); espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólicas da parede posterior (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A massa do VE (MVE) e o índice de massa do VE (IMVE) foram calculados de acordo

com as seguintes fórmulas: $MVE = [(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - DSVE^3] \times 1,04$; $IMVE = MVE/\text{peso corporal}$. A espessura relativa do VE (Esp. Rel. VE) foi calculada segundo a fórmula: $\text{Esp. Rel. VE} = 2 \times EDPP/DDVE$. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. Endo): $[(DDVE - DSVE)/DDVE]$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% enc. Meso): $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)/(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)]$; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior; 4) índice de performance miocárdica (Tei). 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 em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca (TRIV/R-R).

Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico foi realizado em esteira, cinco vezes por semana. Inicialmente, houve período de adaptação, com aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício (78), conforme tabela abaixo. A partir da sexta semana de treinamento, os ratos exercitaram-se à velocidade de 12 m/min e duração de 30 min, até o final do período experimental de quatro meses.

Semanas	Velocidade (m/min)	Duração (min)
1 ^a	5	10
2 ^a	7,5	12
3 ^a	10	15
4 ^a	12	20
5 ^a	12	25
6 ^a em diante	12	30

Teste de esforço

Antes e após o período de treinamento físico, os ratos foram submetidos a teste de esforço em esteira, como descrito por Rodrigues *et al* (79). Após cinco minutos de adaptação na esteira, a velocidade foi aumentada em três metros por minuto, a cada três minutos, até os animais atingirem a exaustão. No teste, avaliamos a distância percorrida e o tempo total de permanência na esteira.

Coleta da musculatura esquelética e de outros tecidos para análise

Ao 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 e esquerdo dissecados e pesados separadamente.

A seguir, foram dissecados os músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio dos membros pélvicos direito e esquerdo. Imediatamente após a dissecação e pesagem, as amostras musculares foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. Para avaliar o grau de congestão pulmonar, os pulmões foram dissecados e pesados. Para normalizar as estruturas cardíacas, a tíbia direita foi dissecada e mensurada em seu maior comprimento.

Análise histológica da musculatura esquelética e miocárdica

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido muscular esquelético e cardíaco 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. A seguir, os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina para análise morfológica geral e mensuração da área seccional e do menor diâmetro transversal das fibras e pelo

método tricrômico de Masson para a mensuração da fração intersticial de colágeno. A avaliação do tamanho das fibras musculares e da fração de colágeno intersticial foi realizada por 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). Em cada lâmina, corada por hematoxilina e eosina, foi efetuada a mensuração das áreas de pelo menos 150 fibras musculares, segundo os critérios preconizados por Dubowitz (80). Nas lâminas coradas por tricrômico de Masson, a mensuração foi efetuada em pelo menos 20 campos histológicos.

Expressão gênica

A análise dos mRNAs da miostatina e folistatina e dos genes de referência GAPDH e ciclofilina foi realizada em fragmentos dos músculos esqueléticos e cardíaco por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR), conforme previamente descrito (20, 53, 75, 76).

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-proteicos. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente. O material foi então 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 inicialmente) 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 1,0 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol previamente utilizado) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4 °C. Após secar por 10 min à temperatura

ambiente, o sedimento de RNA foi ressuspensão em solução 0,01% de DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60 °C, por 10 min, para 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 (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific, NanoDrop Technologies, Inc), a razão entre 260 e 280 nm, o que forneceu estimativa da qualidade do processo de extração. Todas as amostras do estudo apresentaram razão entre 1,8 e 2,1.

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. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S.

Transcrição reversa (RT) do RNA

A RT do RNA foi realizada utilizando-se os componentes do *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil). Mistura contendo 1 µg de RNA total, 1 µL de dNTP mix 10 mM e 1 µL de Random Hexamers (50 ng/µL), com volume total ajustado para 10 µL de H₂O tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), foi incubada por 5 min a 65 °C. A seguir, foram adicionados 9 µL de solução contendo 2 µL de tampão RT 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de RNase recombinante RNaseOUT™ (40 unidades/µL). Após leve agitação e incubação a 42 °C por 2 min, foi adicionado à reação 1 µL da enzima *SuperScript™ II RT* (50 unidades/µL) e a mistura foi novamente incubada por 50 min a 42 °C. A seguir, a mistura da reação foi colocada no gelo e adicionado 1 µL de RNase H para, finalmente, incubar a mistura por 20 min a 37 °C. Para comprovar a ausência de DNA genômico residual nas amostras de RNA submetidas à reação de RT, amostra de RNA (controle negativo da RT) foi

submetida à reação de RT acima descrita com a substituição da enzima SuperScript™ II RT por 1 µL de H₂O com DEPC. O produto da reação foi utilizado em todas as reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Alíquotas da reação de RT de cada amostra contendo 10-100 ng de cDNA foram adicionadas a mistura contendo 10 µL *2X TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio pré-otimizado (20X) contendo sonda *FAM dye-labeled Taqman MGB* e primers “sense” e “antisense” não marcados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), específicos para cada gene. Para obter volume final de 20 µL, foi adicionada água tratada com DEPC. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene alvo e para os genes de referência no Sistema *Real Time PCR 7500* (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 gráfico de amplificação mostrando aumento do *reporter dye* fluorescente em cada ciclo da PCR. A partir do gráfico, foi determinado o ciclo em que a reação atinge o limiar de detecção (*critical threshold cycle - C_T*), baseado na variabilidade dos dados da linha de base obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR. A quantificação foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Expressão proteica

A quantificação proteica de miostatina e folistatina foi avaliada por Western blot (13, 27, 81, 82). A proteína muscular esquelética e cardíaca foi extraída em tampão RIPA e quantificada pelo método de Bradford. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose (Biorad). Após bloqueio da membrana, foi realizada incubação com anticorpos primários anti-miostatina (N-19, sc 6885), anti-

folistatina (H-114, sc 30194) e anti-GAPDH (6C5, sc 32233, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). 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 fotografados com analisador de imagens (Carestream Molecular Imaging, Carestream, Inc, USA).

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 de acordo com a normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) para o esquema fatorial 2X2, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Mann-Witney (valor de $p \times 2$). A comparação da frequência de sinais de insuficiência cardíaca entre os grupos foi realizada pelo teste de Goodman. O nível de significância considerado foi de 5%.

4. RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

Ao final do período experimental, o grupo WKY-Sed tinha 17 ratos, sendo que 1 apresentou derrame pleural e 1 ascite. No grupo WKY-Ex, com 18 ratos, 1 animal apresentou taquipneia e 3 derrame pleural. O grupo SHR-Sed, ao final do experimento, estava composto por 19 ratos, que apresentaram a seguinte frequência de alterações compatíveis com insuficiência cardíaca: taquipneia 7 animais, derrame pleural 14, ascite 9, trombo em átrio esquerdo 1, hipertrofia do ventrículo direito 1 e congestão hepática 4. No grupo SHR-Ex (n=22), a frequência dos sinais de insuficiência cardíaca foi taquipnéia 1 animal, derrame pleural 6, ascite 1, trombo em átrio esquerdo 1 e hipertrofia do ventrículo direito 1 (Figura 1). O grupo SHR-Ex apresentou menor frequência de taquipneia, derrame pleural e ascite que o SHR-Sed (Figura 1).

As variáveis anatômicas, em valores absolutos, estão apresentadas na Tabela 1. O peso corporal inicial e final foi menor nos grupos hipertensos que nos normotensos. A pressão arterial inicial e final foi maior nos ratos hipertensos que nos normotensos. O peso do ventrículo esquerdo foi maior nos ratos normotensos exercitados que nos sedentários e maior nos SHR que nos WKY. No grupo SHR, o treinamento não alterou o peso do VE. O peso do ventrículo direito e dos átrios, em valores absolutos, foi menor nos SHR que nos WKY. O peso do pulmão não diferiu entre os grupos.

Como a diferença de peso corporal, tanto no início como no final do experimento, entre as duas cepas de ratos é grande, há necessidade de normalizar as variáveis anatômicas pelo peso corporal e/ou pelo comprimento da tíbia. Neste estudo, as variáveis foram normalizadas tanto pelo peso corporal (Tabela 2) como pelo comprimento da tíbia (Tabela 3). Quando normalizados pelo peso corporal, os pesos dos ventrículos esquerdo e direito, dos átrios e dos pulmões foram estatisticamente maiores nos animais hipertensos que nos normotensos. A relação peso VE/PC foi maior no grupo WKY-Ex que no WKY-Sed.

O comprimento da tíbia foi menor nos SHR que nos WKY (Tabela 3). A relação peso do VE/comprimento da tíbia foi maior nos grupos hipertensos que nos normotensos. O treinamento físico aumentou essa relação nos WKY e não a

modificou nos SHR. Quando normalizados pelo comprimento da tibia, o peso do ventrículo direito e dos átrios foi menor no grupo SHR-Ex que no WKY-Ex.

O peso dos músculos sóleo, em valores absolutos, foi menor nos grupos SHR que nos WKY. Quando normalizado pelo peso corporal, não diferiu entre os grupos. O peso do músculo gastrocnêmio, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, foi estatisticamente menor nos SHR que nos WKY. O treinamento físico não modificou essas variáveis (Tabela 2). Os pesos dos músculos sóleo e gastrocnêmio normalizados pelo comprimento da tibia foram menores nos grupos SHR que nos WKY (Tabela 3).

Avaliação ecocardiográfica

As variáveis ecocardiográficas estão apresentadas nas Tabelas 4 a 7. Antes do treinamento físico, os diâmetros diastólico e sistólico do VE foram menores nos grupos SHR que nos WKY. Quando normalizado pelo peso do corpo, o diâmetro diastólico do VE foi maior em ambos os grupos SHR que nos WKY. As espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular e os diâmetros da aorta e do átrio esquerdo e a espessura relativa do (VE) foram maiores nos grupos SHR que nos WKY (Tabela 4). As variáveis estruturais cardíacas não diferiram entre os grupos sedentários e exercitados antes do treinamento físico.

Os resultados da avaliação funcional do VE no início do experimento estão apresentados na Tabela 5. O grupo SHR-Ex apresentou frequência cardíaca maior que o WKY-Ex. A porcentagem de encurtamento endocárdico foi maior no SHR-Sed que no WKY-Sed; a velocidade de encurtamento da parede posterior foi maior no grupo WKY-Ex que nos grupos WKY-Sed e SHR-Ex e o índice de performance miocárdica (Tei) foi menor no WKY-Ex que nos grupos WKY-Sed e SHR-Ex. A porcentagem de encurtamento mesocárdico não diferiu entre os grupos. Em relação à função diastólica do VE, a relação E/A não diferiu entre os grupos. O tempo de desaceleração da onda E foi menor no grupo SHR-Sed que no WKY-Sed. O tempo de relaxamento isovolumétrico, em valores absolutos ou normalizados pela frequência cardíaca, foi maior nos grupos SHR que nos WKY. Não observamos

diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHR-Ex e SHR-Sed antes do treinamento físico.

Ao final do período experimental, o diâmetro diastólico do VE, em valores absolutos, não diferiu entre os grupos SHR e WKY (Tabela 6). Entretanto, a relação diâmetro diastólico do VE/peso corporal e o diâmetro sistólico do VE foram maiores nos grupos SHR que nos WKY. As comparações entre os grupos referentes às demais variáveis estruturais cardíacas mostraram o mesmo comportamento que no período inicial. O treinamento físico não alterou os parâmetros estruturais cardíacos.

As variáveis referentes à avaliação final da função do VE estão apresentadas na Tabela 7. Os grupos SHR apresentaram menores valores da porcentagem de encurtamento mesocárdico e maiores valores do índice Tei que os grupos WKY. A porcentagem de encurtamento endocárdico foi menor no SHR-Sed que no WKY-Sed. A frequência cardíaca e a velocidade de encurtamento da parede posterior não diferiram entre os grupos. Em relação à função diastólica do VE, os SHR apresentaram maiores valores do TRIV e do TRIV/R-R que os grupos WKY. O treinamento físico não induziu alterações significantes entre os grupos exercitados e seus respectivos controles sedentários.

Teste de esforço

No teste de esforço inicial, os animais dos grupos hipertensos apresentaram melhor capacidade funcional que os ratos dos grupos normotensos, caracterizada por aumento da distância percorrida e do tempo de permanência na esteira. Inicialmente, a capacidade funcional não diferiu entre os grupos sedentários e exercitados. Ao final do período experimental, o desempenho físico foi melhor nos grupos hipertensos que nos normotensos e nos ratos exercitados que nos sedentários (Tabela 8).

Análise histológica

A área seccional do músculo sóleo foi menor no grupo SHR-Ex que no grupo WKY-Ex e a área da porção branca do gastrocnêmio foi menor nos grupos hipertensos que nos normotensos (Tabela 9). No ventrículo esquerdo, a área seccional dos miócitos não diferiu estatisticamente entre os grupos e o diâmetro dos miócitos foi maior no grupo SHR-Sed que no WKY-Sed. Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos sóleo e gastrocnêmio e do ventrículo esquerdo são mostradas nas figuras 2 a 4, respectivamente.

Os valores da fração de colágeno intersticial estão apresentados na Tabela 10. Nos músculos sóleo e gastrocnêmio, a fração de colágeno intersticial não diferiu entre os grupos. No ventrículo esquerdo, os grupos SHR apresentaram maior fração de colágeno intersticial que seus respectivos controles normotensos. Imagens representativas de cortes histológicos dos músculos sóleo, gastrocnêmio e ventrículo esquerdo são mostradas nas figuras 5 a 7, respectivamente.

Expressão gênica

Os resultados da expressão gênica estão apresentados na Tabela 11. No músculo sóleo, não foram observadas diferenças entre os grupos na expressão gênica da miostatina ou da folistatina após normalização pelos genes constitutivos ciclofilina e GAPDH. Na porção branca do músculo gastrocnêmio, a expressão da miostatina foi maior no SHR-Sed que no WKY-Sed. O treinamento físico reduziu a expressão gênica da miostatina no grupo SHR-Ex. A expressão da folistatina não diferiu significativamente entre os grupos. No miocárdio, a expressão gênica da miostatina não diferiu entre os grupos. A folistatina foi significativamente maior nos grupos hipertensos que nos respectivos controles normotensos.

Expressão proteica

Os resultados da expressão proteica estão apresentados na Tabela 12. No músculo sóleo, a expressão da miostatina foi menor no grupo SHR-Ex que no WKY-Ex e a expressão da folistatina não diferiu entre os grupos. Na porção branca do músculo gastrocnêmio, a miostatina e a folistatina não diferiram estatisticamente entre os grupos. No ventrículo esquerdo, a expressão da miostatina foi maior nos animais hipertensos que nos respectivos controles normotensos e a folistatina não diferiu entre os grupos.

Tabela 1. Variáveis anatômicas

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
PC inicial (g)	618±65	644±46	401±24*	388±25 [#]
PC final (g)	614 (551-702)	620 (566-688)	392 (376-400)*	368 (359-384) [#]
PA inicial (mmHg)	123 (114-125)	122 (118-126)	187 (184-204)*	190 (180-212) [#]
PA final (mmHg)	126 (115-132)	135 (127-138)	210 (199-224)*	220 (215-235) [#]
VE (g)	0,95 (0,91-1,00)	1,05 (1,01-1,12)*	1,21 (1,16-1,25)*	1,17 (1,09-1,25) [#]
VD (g)	0,28 (0,26-0,30)	0,29 (0,27-0,32)	0,24 (0,22-0,27)*	0,23 (0,21-0,25) [#]
Átrios (g)	0,13 (0,12-0,15)	0,14 (0,13-0,16)	0,11 (0,09-0,12)*	0,10 (0,10-0,11) [#]
Pulmão (g)	2,94±0,37	2,99±0,50	3,06±0,56	2,76±0,45

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=18); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=19); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=19); PC: peso corporal; PA: Pressão arterial sistólica; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey. * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 2. Variáveis anatômicas normalizadas pelo peso corporal

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
VE/PC (mg/g)	1,54 (1,49-1,64)	1,64 (1,57-1,83)*	3,02 (2,92-3,22)*	3,18 (2,98-3,23)#
VD/PC (mg/g)	0,45 (0,40-0,49)	0,48 (0,44-0,54)	0,62 (0,58-0,65)*	0,63 (0,58-0,66)#
Átrios/PC (mg/g)	0,20 (0,18-0,24)	0,23 (0,20-0,26)	0,25 (0,23-0,31)*	0,29 (0,26-0,31)#
Pulmão/PC (mg/g)	4,46 (4,06-4,92)	4,79 (4,55-5,39)	7,64 (7,10-8,86)*	7,21 (6,90-8,56)#
Sóleo (g)	0,222±0,04	0,224±0,02	0,143±0,01*	0,138±0,02#
Sóleo/PC (mg/g)	0,38 (0,34-0,39)	0,37 (0,34-0,38)	0,37 (0,35-0,38)	0,36 (0,34-0,41)
Gastro (g)	2,83±0,41	2,96±0,34	1,66±0,13*	1,59±0,17#
Gastro/PC (mg/g)	4,74 (4,33-4,99)	4,92 (4,53-5,06)	4,32 (4,14-4,43)*	4,34 (4,11-4,52)#

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=18); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=19); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=19); PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; gastro: músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey. **P* < 0,05 vs WKY-Sed; # *P* < 0,05 vs WKY-Ex.

Tabela 3. Variáveis anatômicas normalizadas pelo comprimento da tíbia

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
Tíbia (cm)	4,80 (4,64-4,85)	4,78 (4,75-4,85)	4,15 (4,11-4,20)*	4,15 (4,15-4,20)#
VE/Tíbia (mg/cm)	0,20 (0,19-0,21)	0,22 (0,21-0,23)*	0,29 (0,28-0,30)*	0,28 (0,26-0,30)#
VD/Tíbia (mg/cm)	0,06 (0,05-0,06)	0,06 (0,06-0,07)	0,06 (0,05-0,06)	0,05 (0,05-0,06)#
Átrios/Tíbia (mg/cm)	0,03 (0,03-0,03)	0,03 (0,03-0,03)	0,03 (0,02-0,03)	0,02 (0,02-0,03)#
Sóleo/Tíbia (mg/cm)	0,05±0,01	0,05±0,01	0,03±0,01*	0,03±0,01#
Gastro/Tíbia (mg/cm)	0,62 (0,53-0,65)	0,62 (0,59-0,66)	0,40 (0,38-0,42)*	0,40 (0,36-0,41)#

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=18); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=19); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=19); VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; gastro: músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey; **P* < 0,05 vs WKY-Sed; #*P* < 0,05 vs WKY-Ex.

Tabela 4. Análise ecocardiográfica inicial das variáveis cardíacas estruturais

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
DDVE (mm)	8,22 (7,89-8,64)	8,15 (7,97-8,35)	7,50 (7,34-7,97)*	7,72 (7,42-7,95)#
DDVE/PC (mm/kg)	13,1 (12,5-13,6)	13,1 (11,9-13,9)	19,4 (17,9-19,8)*	19,8 (19,0-21,4)#
DSVE (mm)	4,26±0,56	4,35±0,91	3,52±0,68*	3,81±0,45#
EDPP (mm)	1,57±0,14	1,54±0,11	1,80±0,13*	1,81±0,14#
EDSIV (mm)	1,57±0,14	1,55±0,11	1,81±0,12*	1,81±0,13#
MVE (g)	0,96±0,12	0,96±0,26	1,03±0,15	1,04±0,15
IMVE (mg/g)	1,54±0,19	1,56±0,43	2,54±0,39*	2,70±0,42#
AO (mm)	4,30 (4,20-4,50)	4,20 (4,20-4,40)	4,90 (4,73-5,00)*	4,70 (4,70-5,05)#
AE (mm)	5,23±0,56	5,53±0,65	6,48±0,48*	6,72±0,70#
Esp. Rel. VE	0,38±0,05	0,37±0,03	0,47±0,04*	0,47±0,04#

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=14); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=16); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=11); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=19); DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; PC: peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; # $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 5. Análise ecocardiográfica inicial da função do ventrículo esquerdo

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
FC (bpm)	246 ± 42,2	251 ± 36,6	269 ± 41,1	283 ± 45,5 [#]
% enc. Endo.	48,5 ± 4,61	48,0 ± 5,40	54,3 ± 7,02*	50,5 ± 4,32
% enc. Meso.	26,6 ± 3,23	26,7 ± 3,52	29,1 ± 4,67	26,8 ± 2,67
VEPP (mm/s)	33,8 ± 2,31	38,5 ± 4,27*	31,9 ± 2,83	33,4 ± 3,37 [#]
Tei	0,58 ± 0,10	0,48 ± 0,07*	0,64 ± 0,07	0,61 ± 0,10 [#]
Onda E (cm/s)	72,4 ± 10,9	77,1 ± 10,5	86,1 ± 8,23*	82,7 ± 15,0
Onda A (cm/s)	45,1 ± 12,2	56,1 ± 14,9	68,2 ± 23,2*	71,5 ± 27,8 [#]
E/A	1,72 ± 0,49	1,44 ± 0,29	1,39 ± 0,47	1,35 ± 0,56
TDE (ms)	50,8 ± 9,60	52,4 ± 6,17	43,2 ± 6,34*	46,4 ± 3,24
TRIV (ms)	33,0 (33,0-33,0)	30,0 (30,0-33,0)	41,0 (37,0-41,0)*	33,0 (33,0-37,0) [#]
TRIV/R-R	69,7 (62,6-71,3)	63,0 (56,4-70,1)	79,6 (76,0-90,6)*	74,9 (70,5-82,2) [#]

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=14); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=16); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=11); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=19); FC: frequência cardíaca; % enc. Endo e Meso: porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, respectivamente; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; 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; R-R: intervalo entre ondas R do eletrocardiograma. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 6. Análise ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
DDVE (mm)	8,19±0,61	8,49±0,87	8,72±0,77	8,30±0,66
DDVE/PC (mm/kg)	13,8±2,30	14,4±2,85	21,9±2,32*	22,2±2,23#
DSVE (mm)	3,42±0,84	3,87±0,85	4,26±0,91*	3,99±0,75
EDPP (mm)	1,58±0,11	1,58±0,10	1,87±0,10*	1,88±0,20#
EDSIV (mm)	1,58±0,12	1,59±0,10	1,88±0,19*	1,88±0,20#
MVE (g)	0,96±0,18	1,03±0,25	1,34±0,24*	1,24±0,26#
IMVE (mg/g)	1,60±0,31	1,74±0,47	3,37±0,65*	3,30±0,59#
AO (mm)	4,34±0,26	4,37±0,24	4,87±0,21*	4,79±0,32#
AE (mm)	5,76±0,80	6,14±0,94	7,26±0,91*	7,04±0,91#
AE/AO	1,33±0,19	1,41±0,22	1,50±0,23*	1,47±0,19
AE/PC (mm/kg)	9,78±2,38	10,4±2,03	18,2±2,06*	18,8±2,47#
Esp. Rel. VE	0,39±0,03	0,37±0,03	0,43±0,04*	0,45±0,06#

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=15); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=13); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=16); DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; PC: peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; MVE: massa do VE; IMVE: índice de MVE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; # $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 7. Análise ecocardiográfica final da função do ventrículo esquerdo

	WKY-Sed	WKY-Ex	SHR-Sed	SHR-Ex
FC (bpm)	276 (230-340)	275 (237-312)	312 (272-331)	285 (260-304)
% enc. Endo.	58,6 ± 8,20	54,8 ± 5,86	51,5 ± 7,69*	52,2 ± 6,13
% enc. Meso.	29,8 ± 5,05	27,9 ± 5,05	25,2 ± 4,60*	23,9 ± 3,71 [#]
VEPP (mm/s)	40,3 (35,4-41,6)	38,0 (33,6-40,0)	34,5 (31,6-38,6)	35,0 (32,8-37,1)
Tei	0,51 (0,45-0,52)	0,51 (0,49-0,56)	0,65 (0,56-0,73)*	0,63 (0,60-0,65) [#]
Onda E (cm/s)	74,5 (72,0-78,0)	80,0 (67,8-91,5)	80,0 (67,8-91,5)	70,0 (66,3-82,5)
Onda A (cm/s)	60,0 ± 17,9	61,5 ± 19,5	66,1 ± 22,7	53,4 ± 15,6
E/A	1,34 ± 0,39	1,35 ± 0,41	1,38 ± 0,62	1,45 ± 0,36
TDE (ms)	48,0 (45,0-48,8)	46,5 (45,0-52,0)	41,0 (40,0-45,8)	41,0 (37,8-49,0)
TRIV (ms)	33,0 (26,0-33,0)	30,0 (26,0-33,0)	33,0 (33,0-41,0)*	37,0 (37,0-41,0) [#]
TRIV/R-R	64,3 ± 8,73	62,0 ± 8,61	80,8 ± 14,0*	81,3 ± 6,75 [#]

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=15); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=13); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=16); FC: frequência cardíaca; % enc. Endo e Meso: porcentagem de encurtamento endocárdico e mesocárdico, respectivamente; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; 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; R-R: intervalo entre ondas R no eletrocardiograma. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 8. Teste de esforço

	Inicial		Final	
	Distância (m)	Tempo (min)	Distância (m)	Tempo (min)
WKY-Sed	127 ± 24,1	14,1 ± 1,49	131 ± 29,7	15,3 ± 2,10
WKY-Ex	123 ± 24,8	13,8 ± 1,59	233 ± 68,5*	21,0 ± 3,46*
SHR-Sed	291 ± 46,6*	22,4 ± 1,97*	242 ± 34,2*	21,7 ± 1,87*
SHR-Ex	263 ± 66,6 [#]	21,1 ± 2,92 [#]	394 ± 65,4 ^{# §}	28,4 ± 2,40 ^{# §}

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (inicial n=10, final n= 17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (inicial n=10, final n= 18); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (inicial n=10, final n= 19); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (inicial n=10, final n= 19). Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex; [§] $P < 0,05$ vs SHR-Sed.

Tabela 9. Análise morfométrica dos miócitos

	Área Seccional (μm^2)			Diâmetro (μm)
	Sóleo	Gastrocnêmio	VE	VE
WKY-Sed	3053 $\pm$ 490	3412 $\pm$ 193	521 $\pm$ 66,7	19,7 $\pm$ 0,70
WKY-Ex	2946 $\pm$ 221	3780 $\pm$ 289	515 $\pm$ 102	20,4 $\pm$ 1,31
SHR-Sed	2422 $\pm$ 123*	2734 $\pm$ 338*	609 $\pm$ 127	22,3 $\pm$ 2,38*
SHR-Ex	2364 $\pm$ 252 [#]	2786 $\pm$ 438 [#]	533 $\pm$ 93,0	21,1 $\pm$ 1,62

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=5); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=5); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=5); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=5). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 10. Análise morfométrica do colágeno

	Fração Intersticial de Colágeno (%)		
	Sóleo	Gastrocnêmio	VE
WKY-Sed	5,12 ± 1,07	3,71 ± 1,65	7,21 ± 0,64
WKY-Ex	5,18 ± 1,33	3,93 ± 1,23	6,47 ± 1,45
SHR-Sed	6,03 ± 0,46	3,45 ± 0,87	9,07 ± 1,22*
SHR-Ex	5,71 ± 0,95	3,64 ± 1,04	8,21 ± 1,71 [#]

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=8); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=8); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=8); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=8). Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

Tabela 11. Expressão gênica (unidades arbitrárias)

	Sóleo		Gastrocnêmio		Ventrículo Esquerdo	
	Miostatina	Folistatina	Miostatina	Folistatina	Miostatina	Folistatina
WKY-Sed	1,00 ± 0,64	1,00 ± 0,60	1,00 ± 0,33	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,65	1,00 ± 0,30
WKY-Ex	1,56 ± 1,53	0,90 ± 0,78	1,63 ± 0,66	0,85 ± 0,65	0,71 ± 0,63	0,77 ± 0,10
SHR-Sed	1,04 ± 0,70	1,07 ± 1,13	2,09 ± 0,80*	0,95 ± 0,37	1,50 ± 0,73	2,18 ± 0,63*
SHR-Ex	1,00 ± 0,57	0,70 ± 0,45	1,22 ± 0,33 [§]	0,89 ± 0,28	1,04 ± 0,47	1,78 ± 0,82 [#]

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=8); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=8); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=8); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=8). Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey;

* $P < 0,05$ vs WKY-Sed; # $P < 0,05$ vs WKY-Ex; § $P < 0,05$ vs. SHR-Sed.

Tabela 12. Expressão proteica (unidades arbitrárias)

	Sóleo		Gastrocnêmio		Ventrículo Esquerdo	
	Miostatina	Folistatina	Miostatina	Folistatina	Miostatina	Folistatina
WKY-Sed	1,00 ± 0,51	1,00 ± 0,74	1,00 ± 0,72	1,00 ± 0,35	1,00 ± 0,26	0,75 (0,59-1,15)
WKY-Ex	0,95 ± 0,53	0,77 ± 0,48	0,88 ± 1,01	1,33 ± 0,79	1,01 ± 0,34	0,61 (0,26-0,69)
SHR-Sed	0,79 ± 0,17	0,54 ± 0,36	1,53 ± 0,57	1,17 ± 0,70	1,81 ± 0,94*	0,64 (0,30-0,97)
SHR-Ex	0,46 ± 0,15 [#]	0,69 ± 0,64	1,28 ± 1,29	1,84 ± 0,55	2,24 ± 0,57 [#]	0,58 (0,47-1,14)

WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=7); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=7); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=7); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=7). Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. ANOVA e Tukey; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed; [#] $P < 0,05$ vs WKY-Ex.

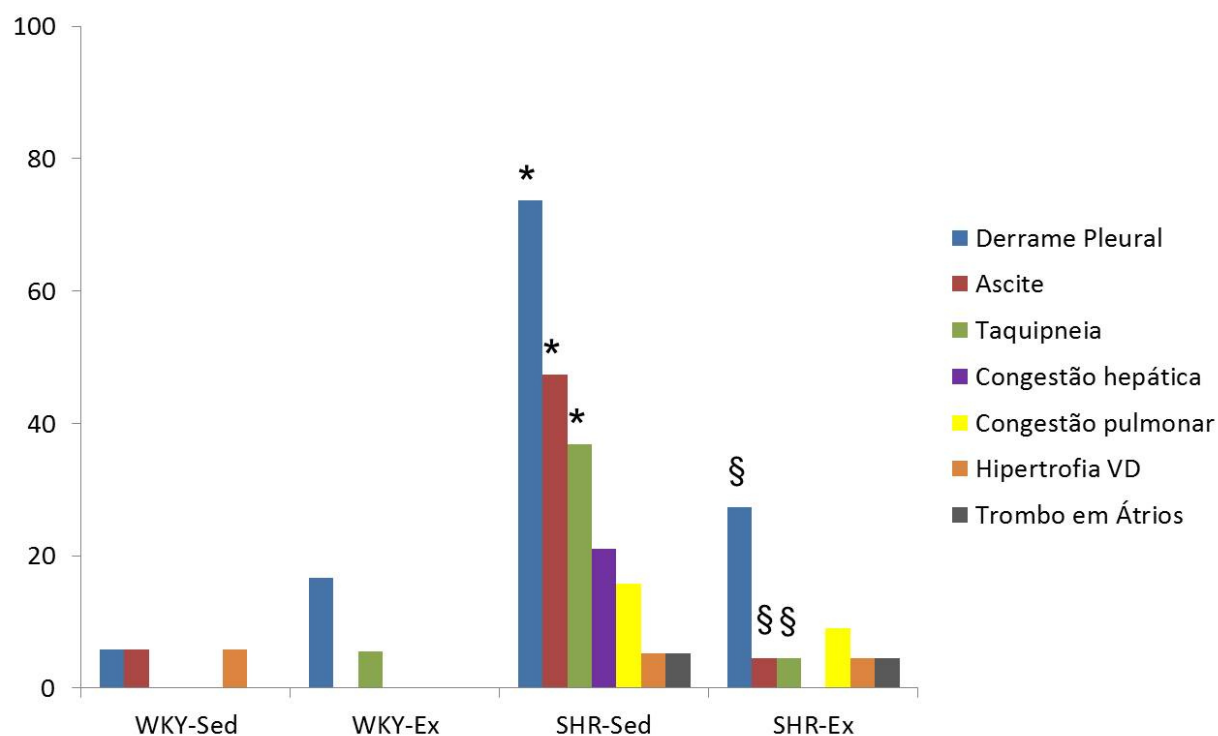


Figura 1. Frequência dos sinais clínico (taquipneia) e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca. WKY-Sed: rato normotenso sedentário (n=17); WKY-Ex: rato normotenso exercitado (n=18); SHR-Sed: rato espontaneamente hipertenso sedentário (n=19); SHR-Ex: rato espontaneamente hipertenso exercitado (n=22). Dados expressos em porcentagem. Goodman; * $P < 0,05$ vs WKY-Sed, § $P < 0,05$ vs SHR-Sed.

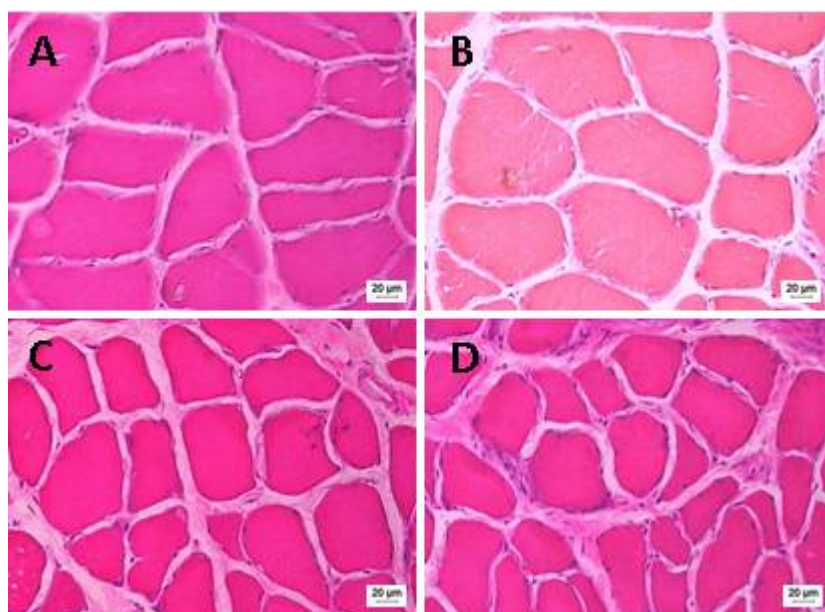


Figura 2. Cortes histológicos do músculo esquelético sóleo corados por hematoxilina-eosina. A: rato Wistar-Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

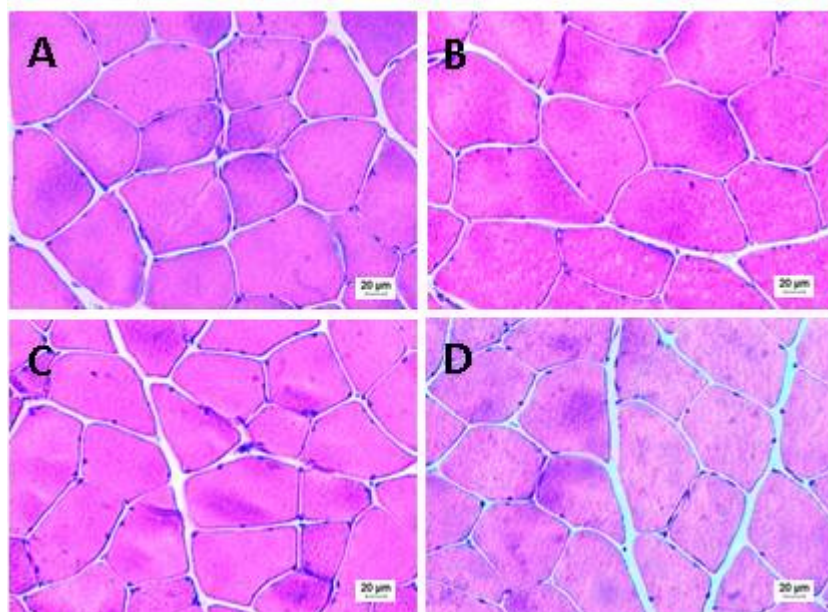


Figura 3. Cortes histológicos da porção branca do músculo esquelético gastrocnêmio corados por hematoxilina-eosina. A: rato Wistar- Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

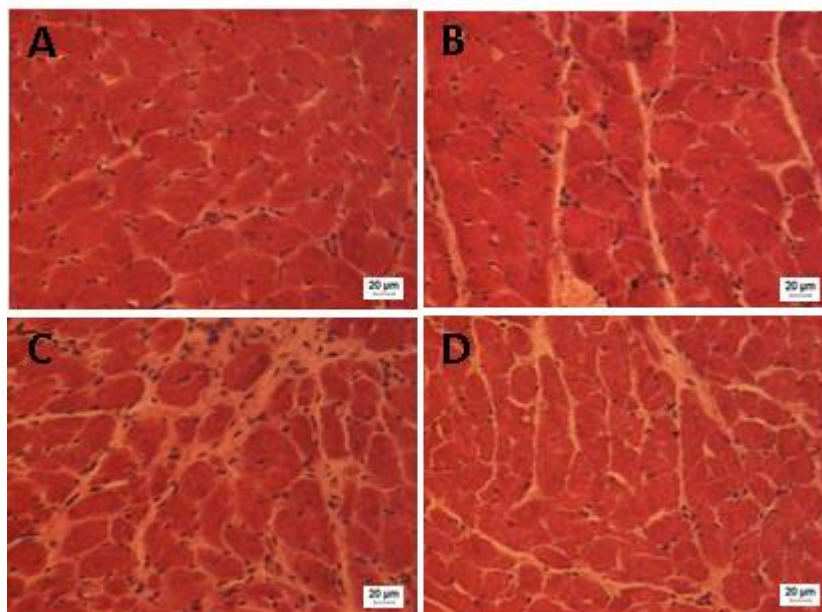


Figura 4. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados por hematoxilina-eosina. A: rato Wistar-Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

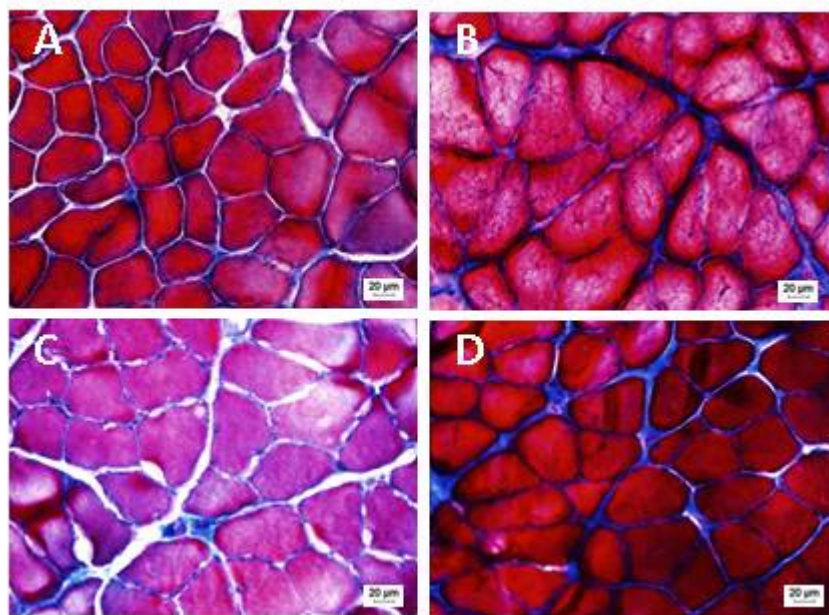


Figura 5. Cortes histológicos do músculo esquelético sóleo corados por tricrômico de Masson. A: rato Wistar-Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

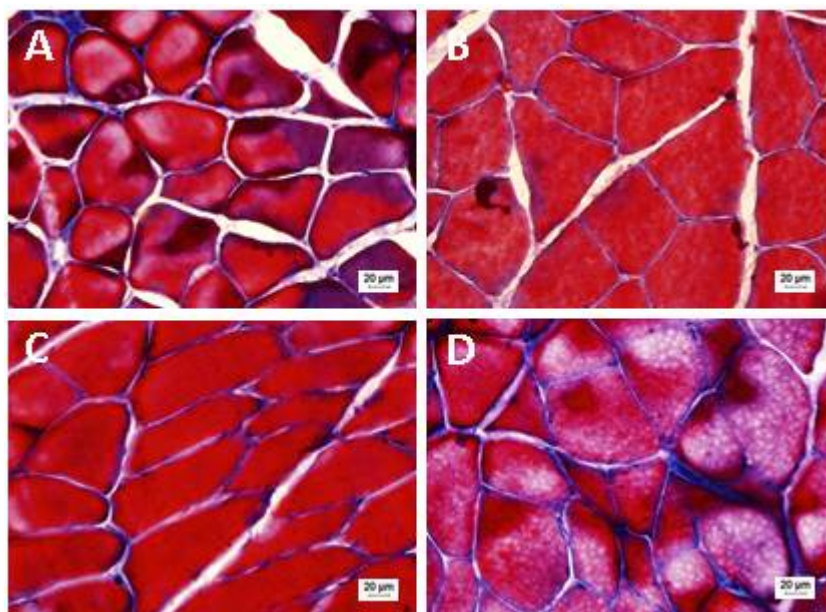


Figura 6. Cortes histológicos da porção branca do músculo esquelético gastrocnêmio corados por tricrômico de Masson. A: rato Wistar-Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

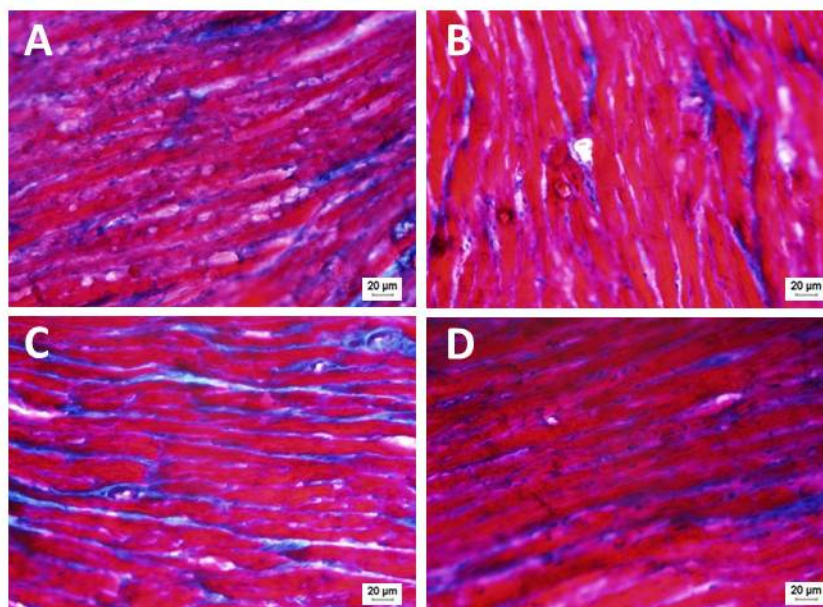


Figura 7. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados por tricrômico de Masson. A: rato Wistar-Kyoto sedentário; B: rato Wistar-Kyoto exercitado; C: rato espontaneamente hipertenso sedentário; D: rato espontaneamente hipertenso exercitado; 40X.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo avaliar se atrofia da musculatura esquelética de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca está associada a alterações na via de sinalização intracelular miostatina/folistatina. Adicionalmente, foi investigado se o treinamento físico aeróbio atenua o processo de atrofia e/ou modula a expressão das proteínas miostatina/folistatina nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio e no miocárdio de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca.

Os ratos espontaneamente hipertensos foram introduzidos por Okamoto e Aoki (69) como modelo genético de hipertensão arterial sistêmica, cuja história natural assemelha-se à que ocorre em humanos com hipertensão não controlada (70, 71). Hipertensão arterial persistente se desenvolve nos SHR a partir de um mês de idade e hipertrofia ventricular esquerda pode ser observada a partir de três meses de idade (69, 70). A seguir, ocorre período relativamente longo de hipertrofia cardíaca compensada, sem evidências clínicas de insuficiência cardíaca. Após os 12 meses de idade, pode-se detectar disfunção diastólica do ventrículo esquerdo à ecocardiografia (73). Somente a partir de 18 meses de idade, os animais começam a desenvolver evidências clínicas de insuficiência cardíaca, evoluindo, então, para óbito, em geral dentro de duas a três semanas (72). O padrão de evolução insidiosa da doença, desde o desenvolvimento da hipertensão arterial até a fase de insuficiência cardíaca, faz com que os ratos espontaneamente hipertensos sejam considerados um bom modelo experimental para estudos relacionados ao desenvolvimento crônico de hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (72).

Como a partir de 18 meses, pode haver mortalidade elevada (75), iniciamos o protocolo de exercícios físicos com 16 meses de idade. Com isso, procurou-se avaliar os efeitos do treinamento físico em ratos com idade próxima à qual insuficiência cardíaca habitualmente se manifesta. A escolha do protocolo de treinamento foi baseada em resultados de estudos prévios, nos quais foi observado que treinamento de baixa intensidade aumenta a sobrevida e retarda o aparecimento de insuficiência cardíaca descompensada em ratos espontaneamente hipertensos (78, 83).

O teste de esforço inicial mostrou que os SHR apresentam melhor capacidade funcional que os WKY, caracterizada pela maior distância percorrida e maior tempo de permanência na esteira. Estudos prévios têm mostrado que SHR são mais espontaneamente ativos que ratos normotensos, o que seria responsável por sua melhor capacidade funcional (84, 85). Ao final do período experimental, a distância percorrida e o tempo de permanência na esteira foram maiores nos SHR que nos WKY e nos ratos exercitados que nos sedentários. Os resultados mostram que o treinamento físico aumentou a capacidade funcional de ambas as cepas de ratos, normotensos e hipertensos.

No momento da eutanásia, a presença de insuficiência cardíaca foi caracterizada por dados clínico e anátomo-patológicos. O grupo SHR-Sed apresentou maior frequência de derrame pleural, ascite e taquipneia que o grupo WKY-Sed. Já o grupo SHR-Ex apresentou menor frequência de derrame pleural, ascite e taquipneia que o SHR-Sed, o que sugere que o treinamento físico retardou o surgimento de insuficiência cardíaca. Sinais mais tardios de insuficiência cardíaca, entretanto, como congestão pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito, foram pouco frequentes em ambos os grupos SHR e não se alteraram com o exercício físico. Também em SHR mais jovens, com 15 meses de idade, ou mais velhos, com 22 meses, o treinamento físico de baixa intensidade retardou o aparecimento da insuficiência cardíaca (78). Os ratos normotensos WKY apresentaram pequena frequência de sinais de insuficiência cardíaca e que não diferiu entre os grupos sedentário e exercitado. A presença dos sinais provavelmente reflete a ocorrência de alterações fisiopatológicas em ratos normotensos com idade relativamente avançada.

Os valores da pressão arterial inicial confirmaram as condições de normotensos para os ratos WKY e de hipertensos para os SHR. O treinamento físico não alterou a pressão arterial em ambas as cepas. Estudos prévios mostraram que, diferentemente do que ocorre em humanos, em ratos espontaneamente hipertensos, o exercício físico aeróbio não induz redução da pressão arterial (86, 87).

Os animais dos grupos SHR apresentaram peso corporal menor que os ratos WKY. Este achado é comum nesta cepa de ratos, que habitualmente apresenta

aumento da atividade adrenérgica e do grau de atividade física espontânea (13, 72, 88-92). O menor peso corporal dos SHR dificulta a comparação dos valores de variáveis anatômicas com os de ratos WKY. Assim, autores que realizam experimentos com SHR habitualmente normalizam os valores das variáveis anatômicas pelo peso do corpo e, também, pelo comprimento da tibia (13, 72, 88-93), o que foi feito neste estudo.

O peso do ventrículo esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal ou comprimento da tibia, foi maior nos animais hipertensos que nos normotensos, caracterizando a presença de hipertrofia ventricular esquerda causada pela hipertensão arterial de longa evolução (70, 73). Os ratos normotensos treinados apresentaram discreto aumento do peso do ventrículo esquerdo. Este fato tem sido comumente observado com o treinamento físico, sendo denominado hipertrofia fisiológica (94). Nos SHR, o peso do ventrículo esquerdo não se alterou com o exercício físico. Entretanto, à análise morfométrica, o treinamento parece ter atenuado o grau de hipertrofia dos miócitos, uma vez que seu diâmetro foi maior no grupo SHR-Sed que em seu respectivo controle WKY-Sed e não diferiu entre SHR-Ex e WKY-Ex. Além disso, embora sem significância estatística, a área seccional dos SHR-Ex foi aproximadamente 12 % menor que no SHR-Sed. Portanto, nossos dados sugerem que o exercício físico, mesmo sem alterar a pressão arterial, tenha atenuado o grau de hipertrofia miocitária.

Ecocardiograma transtorácico foi realizado para caracterizar o grau de injúria cardíaca nos SHR e os efeitos do treinamento físico sobre o processo de remodelação cardíaca. Previamente ao treinamento físico, não havia diferenças significantes nas variáveis estruturais cardíacas e funcionais do ventrículo esquerdo entre os grupos SHR. Quando comparados aos WKY, os SHR apresentaram hipertrofia ventricular concêntrica, caracterizada pelo aumento da espessura relativa do ventrículo esquerdo, e disfunção diastólica, caracterizada pelo aumento do diâmetro do átrio esquerdo e do tempo de relaxamento isovolumétrico, em valores absolutos ou normalizados pela frequência cardíaca. Os resultados estão de acordo com os observados em SHR nesta faixa etária (71, 72, 88, 89, 95). A utilização do índice espessura relativa para caracterização de hipertrofia ventricular concêntrica é sujeita a crítica quando os animais apresentam grande

variação entre os pesos corporais, como em nosso estudo. Embora o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, em valores absolutos, seja aproximadamente 5 a 9 % menor nos SHR que nos WKY, seus valores, quando normalizados pelo peso do corpo torna-se cerca de 50 % maior nos SHR que nos WKY. Desta forma, não podemos afirmar, com certeza, que os SHR encontravam-se, ainda, em fase compensada de hipertrofia concêntrica.

Interessantemente, não detectamos influência do treinamento físico sobre o processo de remodelação cardíaca, tanto em variáveis estruturais como funcionais do ventrículo esquerdo tanto nos ratos WKY como nos SHR. No final do período experimental, quando comparados aos WKY, os SHR mantiveram-se com hipertrofia ventricular concêntrica e disfunção diastólica. Adicionalmente, apresentaram disfunção sistólica, caracterizada por redução da porcentagem de encurtamento mesocárdico e aumento do índice Tei. Em corações de ratos com hipertrofia ventricular por sobrecarga pressórica, a porcentagem de encurtamento mesocárdico reflete melhor o comportamento mecânico da parede ventricular do que a porcentagem de encurtamento endocárdico (96, 97). Também conhecido como índice de performance miocárdica, o índice Tei avalia o comportamento tanto sistólico como diastólico do miocárdico; aumento de seus valores mostra comprometimento da função mecânica do miocárdio (98). Em nosso laboratório, verificamos recentemente que, em SHR, o treinamento físico induz melhora da função diastólica, quando avaliada por Doppler tissular, e do relaxamento miocárdico, analisado em preparações com músculos papilares isolados (99). Não identificamos na literatura outros estudos que tenham avaliado o efeito do treinamento físico no processo de remodelação cardíaca em SHR. Em outros modelos de insuficiência cardíaca, como o infarto do miocárdio em ratos, o treinamento foi associado a melhora da função cardíaca e hemodinâmica (100). Neste estudo concluímos, portanto, que o exercício físico de baixa intensidade, apesar de melhorar a frequência de sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca em SHR, não induz alterações no processo de remodelação cardíaca avaliado por ecocardiografia transtorácica.

Estudos recentes têm mostrado que, em situações de sobrecarga hemodinâmica crônica, o miocárdio produz e secreta miostatina para a circulação

(50). Acredita-se que, ao atingir a musculatura esquelética, a miostatina secretada pelo coração estruturalmente alterado possa inibir tanto o crescimento muscular como a manutenção do trofismo fisiológico (55, 57). Portanto, para avaliar possíveis mecanismos envolvidos no processo de atrofia de músculos esqueléticos, analisamos a expressão da miostatina e seu antagonista folistatina no miocárdio. Nossos resultados mostraram que a expressão proteica de miostatina foi aumentada no ventrículo esquerdo dos SHR em relação aos grupos WKY e não foi alterada pelo treinamento físico. A expressão proteica da folistatina permaneceu inalterada. No coração, a miostatina tem ação pro-fibrótica (55), o que está de acordo com o aumento da fração intersticial de colágeno observado em ambos os grupos SHR. Não identificamos na literatura outros estudos que tenham avaliado a expressão da miostatina no miocárdio de SHR. Em ratos infartados, o treinamento físico impediu aumento da expressão proteica de miostatina no miocárdio (51). Em nosso estudo, o exercício físico não alterou a miostatina miocárdica de ratos saudáveis, o que está de acordo com dados de outros autores (51). Nossos resultados, portanto, mostram que, como em outros modelos experimentais, SHR apresentam aumento da expressão proteica de miostatina no miocárdio. Entretanto, diferentemente do que ocorre em ratos com infarto do miocárdio, o treinamento aeróbio não modula a expressão miocárdica de miostatina em SHR.

Na insuficiência cardíaca, foi constatado que há pobre correlação entre variáveis hemodinâmicas ou de função ventricular em repouso e tolerância aos exercícios físicos (4-6, 101). Assim, os achados deste estudo confirmam os resultados da literatura e reforçam o conceito que a melhora da capacidade funcional decorrente do treinamento físico depende não somente de modulação da função cardiopulmonar, mas também de efeitos diretos na musculatura esquelética. Entretanto, apesar da crescente importância do exercício físico no tratamento não farmacológico da insuficiência cardíaca (51, 78, 83, 100, 102), ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a capacidade funcional.

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada nos músculos sóleo e gastrocnêmio. Estudos prévios de nosso grupo mostraram que esses músculos são sensíveis às alterações induzidas pela insuficiência cardíaca aguda

(103) ou crônica (13, 19, 20, 51, 104). Em ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica (19) ou por infarto do miocárdio (20, 53), observamos redução de 9,7 % a 16,5 % da área seccional das fibras musculares. Na insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina, a diminuição do diâmetro da fibra foi de 9,7 % (103).

Neste estudo, os grupos SHR apresentaram redução do peso dos dois músculos estudados, sóleo e gastrocnêmio, tanto em valores absolutos, como normalizados pelo comprimento da tibia. Os resultados foram confirmados pela análise morfométrica, que mostrou diminuição da área seccional transversa dos músculos nos grupos SHR em relação aos WKY. Resultado semelhante foi observado em estudo prévio em SHR com insuficiência cardíaca (13). A presença de grau importante de atrofia muscular faz com que o modelo seja particularmente útil em estudos para identificação de mecanismos e vias de sinalização intracelular envolvidos na miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. O treinamento aeróbico não alterou o trofismo muscular, tanto nos ratos normotensos, como nos hipertensos.

Como mecanismos potencialmente responsáveis pela atrofia muscular, avaliamos a via miostatina/folistatina. Apesar de não ter modificado o trofismo muscular, o treinamento físico reduziu a expressão proteica da miostatina no músculo sóleo dos SHR, quando comparada ao grupo WKY-Ex. Embora aproximadamente 40 % menor no grupo SHR-Ex que no SHR-Sed, a expressão proteica da miostatina não diferiu estatisticamente entre esses grupos. No músculo gastrocnêmio, os grupos SHR diferiram dos WKY em relação à expressão gênica da miostatina. Essa diferença, entretanto, não se traduziu em alterações significantes na expressão proteica da miostatina. Resultados díspares entre expressão gênica e proteica da miostatina, tanto no miocárdio como no músculo esquelético, têm sido relatados na literatura (51, 55).

Em estudo prévio, avaliamos SHR com grau mais avançado de insuficiência cardíaca, no qual todos os ratos apresentaram hipertrofia do ventrículo direito, e observamos redução da expressão proteica de miostatina e folistatina no músculo sóleo (13). Assim, a preservação da miostatina no presente trabalho pode estar relacionada ao grau menos avançado de insuficiência cardíaca

nos SHR. A redução da expressão proteica de miostatina no grupo SHR-Ex em relação ao WKY-Ex está de acordo com resultados de outros pesquisadores. Lenk et al. (51) mostraram que o exercício físico aeróbio previne aumento na expressão proteica de miostatina em músculos esquelético e cardíaco de ratos com infarto do miocárdio. Também em humanos, o treinamento físico reduziu a expressão de miostatina em músculo esquelético periférico (52, 68). Os resultados do presente estudo sugerem, portanto, que o treinamento físico aeróbio, apesar de reduzir a expressão de miostatina no músculo sóleo, não está associado a preservação do trofismo muscular. Em ratos normotensos, o exercício aeróbio não alterou a expressão de miostatina ou o trofismo muscular. Estes resultados estão de acordo com dados de ratos saudáveis, nos quais o treinamento não alterou a expressão de miostatina em músculos esqueléticos (51).

6. CONCLUSÕES

O treinamento físico melhora a capacidade funcional e reduz a frequência de sinais de insuficiência cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos. O processo de remodelação cardíaca é acompanhado por aumento na expressão proteica de miostatina no miocárdio. O treinamento físico prolongado atenua o grau de hipertrofia miocitária sem, no entanto, modular a expressão miocárdica de miostatina ou folistatina.

Ratos espontaneamente hipertensos apresentam atrofia dos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio, sem alterações concomitantes na expressão proteica de miostatina ou folistatina. O treinamento físico, embora reduza a expressão proteica de miostatina no músculo sóleo, não altera o grau de atrofia muscular.

7. REFERÊNCIAS

1. Liu L, Eisen HJ. Epidemiology of heart failure and scope of the problem. *Cardiol Clin.* 2014;32:1-8.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics-2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6-e245.
3. Albanesi Filho FM. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? *Arq Bras Cardiol.* 2005;85:155-156.
4. Coats AJS. The "muscle hypothesis of chronic heart failure". *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2255-2262.
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. Mancini DM, Walter G, Reichek 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.

11. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation*. 1997;96:526-534.
12. Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1995;269:1507-1513.
13. Damatto RL, Martinez PF, Lima AR, Cezar MD, Campos DH, Oliveira Junior SA, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatani BT, Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol*. 2013;167:698-703.
14. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK. Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Cell Physiol*. 1991;261:H434-H442.
15. Zoll J, Monassier L, Garnier A, N'Guessan B, Mettauier B, Veksler V, Piquard F, Ventura-Clapier R, Geny B. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J Appl Physiol*. 2006;101:385-391.
16. Pfeifer C, Musch TI, Mcallister RM. Skeletal muscle oxidative capacity and exercise tolerance in rats with heart failure. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:542-548.
17. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990;81:518-527.
18. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85:1751-1759.
19. 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.
20. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Lima AR, Campos DH, Damatto RL, Padovani CR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi

- MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Med Sci Monit.* 2010;16:BR374-383.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LA, Campos DH, Oliveira SA, Jr., Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol.* 2010;91:54-62.
 28. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest.* 1999;115:836-847.
 29. 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.

30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280:4294-4314.
34. Guizoni DM, Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. *Rev Soc Bras Clin Med.* 2010;8:266-271.
35. McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1997;387:83-90.
36. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:61-86.
37. 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.
38. 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.
39. 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- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209:501-514.
40. Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan X-Y, Tomkinson KN, Veldman MG, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao

- L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:965-971.
41. Smith RC, Lin BK. Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2013;7:352-360.
 42. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, Flanigan KM, Pestronk A, Tawil R, Wolfe GI, Eagle M, Florence JM, King WM, Pandya S, Straub V, Juneau P, Meyers K, Csimma C, Araujo T, Allen R, Parsons SA, Wozney JM, Lavallie ER, Mendell JR. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2008;63:561-571.
 43. Krivickas LS, Walsh R, Amato AA. Single muscle fiber contractile properties in adults with muscular dystrophy treated with MYO-029. *Muscle Nerve*. 2009;39:3-9.
 44. Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9306-9311.
 45. 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.
 46. 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.
 47. Bowser M, Herberg S, Arounleut P, Shi X, Fulzele S, Hill WD, Isales CM, Hamrick MW. Effects of the activin A-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Exp Gerontol*. 2013;48:290-297.
 48. Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol*. 2010;24:1998-2008.
 49. Lenk K, Palus S, Schur R, Datta R, Dong J, Culler MD, Anker S, Springer J, Schuler G, Adams V. Effect of ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-

- 28125, on the expression of myostatin in a rat heart failure model. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4:63-69.
50. Shyu KG, Lu MJ, Wang BW, Sun HY, Chang H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *Eur J Clin Invest*. 2006;36:713-719.
 51. 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.
 52. Lenk K, Erbs S, Höllriegel R, Beck E, Linke A, Gielen S, Winkler SM, Sandri M, Hambrecht R, Schuler G, Adams V. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19:404-411.
 53. 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 Pathol*. 2010;91:54-62.
 54. Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ, Bass JJ. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*. 1999;180:1-9.
 55. Breitbart A, Auger-Messier M, Molkentin JD, Heineke J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H1973-1982.
 56. George I, Bish LT, Kamalakkannan G, Petrilli CM, Oz MC, Naka Y, Sweeney HL, Maybaum S. Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *Eur J Heart Fail*. 2010;12:444-453.
 57. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation*. 2010;121:419-425.
 58. Bish LT, Morine KJ, Sleeper MM, Sweeney HL. Myostatin is upregulated following stress in an Erk-dependent manner and negatively regulates

- cardiomyocyte growth in culture and in a mouse model. *PloS One*. 2010;5:e10230.
59. Shyu KG, Ko WH, Yang WS, Wang BW, Kuan P. Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2005;68:405-414.
 60. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, Tjonna AE, Helgerud J, Slordahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen O, Skjaerpe T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. A randomized study. *Circulation*. 2007;115:3086-3094.
 61. Nilsson BB, Westheim A, Risberg MA. Effects of group-based high-intensity aerobic interval training in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2008;102:1361-1365.
 62. Beniaminovitz A, Lang CC, LaManca J, Mancini DM. Selective low-level leg muscle training alleviates dyspnea in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1602-1608.
 63. Miche E, Roelleke E, Wirtz U, Zoller B, Tietz M, Huerst M, Radzewitz A. Combined endurance and muscle strength training in female and male patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*. 2008;97:615-622.
 64. Wall HK, Ballard J, Troped P, Njike VY, Katz DL. Impact of home-based, supervised exercise on congestive heart failure. *Int J Cardiol*. 2010;145:267-270.
 65. Flynn KE, Pina IL, Whellan DJ, Lin L, Blumenthal JA, Ellis SJ, Fine LJ, Howlett JG, Keteyian SJ, Kitzman DW, Kraus WE, Miller NH, Schulman KA, Spertus JA, O'Connor CM, Weinfurt KP. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure. *J Am Med Assoc*. 2009;301:1451-1459.
 66. Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U, Ljubkovic M. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. *Cardiovasc Res*. 2013;99:55-64.
 67. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip

GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P, Guidelines ESCCfP. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:803-869.

68. Piepoli MF, Conraads V, Corra U, Dickstein K, Francis DP, Jaarsma T, McMurray J, Pieske B, Piotrowicz E, Schmid JP, Anker SD, Solal AC, Filippatos GS, Hoes AW, Gielen S, Giannuzzi P, Ponikowski PP. Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:347-357.
69. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-293.
70. 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.
71. 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.
72. 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.

73. Oliveira Jr SA, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Martinez PF, Okoshi MP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Cicogna AC. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:526-533.
74. Carvalho RF, Dariolli R, Justolin Junior LA, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:437-443.
75. Cezar MD, Damatto RL, Martinez PF, Lima AR, Campos DH, Rosa CM, Guizoni DM, Bonomo C, Cicogna AC, Gimenes R, Pagan LU, Okoshi MP, Okoshi K. Aldosterone blockade reduces mortality without changing cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32:1275-1287.
76. Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AA, Cezar MD, Martinez PF, Cicogna AC, Gimenes C, Gimenes R, Okoshi MP, Okoshi K. Diabetes mellitus activates fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:152.
77. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551.
78. Emter CA, McCune SA, Sparagna GC, Radin MJ, Moore RL. Low-intensity training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2030-H2038.
79. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2007;6:38.
80. Dubowitz V. Muscle Biopsy: a Practical Approach. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.

81. 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.
82. 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.
83. Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, Marshall KD, Murphy RC, Moore RL. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension.* 2008;51:1096-1102.
84. Langen B, Dost R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2011;3:1-12.
85. Robinson AM, Hopkins ME, Bucci DJ. Effects of physical exercise on ADHD-like behavior in male and female adolescent spontaneously hypertensive rats. *Dev Psychobiol.* 2011;53:383-390.
86. Renna BF, MacDonnell SM, Reger PO, Crabbe DL, Houser SR, Libonati JR. Relative systolic dysfunction in female spontaneously hypertensive rat myocardium. *J Appl Physiol.* 2007;103:353-358.
87. Lajoie C, Calderone A, Beliveau L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Archiv.* 2004;449:26-32.
88. 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.
89. 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.
90. 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.

91. 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.
92. 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.
93. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation.* 2001;103:155-160.
94. Mendes OC, Sugizaki MM, Campos DS, Damatto RL, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Baldissera V, Padovani CR, Okoshi K, Cicogna AC. Exercise tolerance in rats with aortic stenosis and ventricular diastolic and/or systolic dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100:44-51.
95. 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 supravalvar. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81:562-568.
96. Moreira VO, Castro AVB, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, Aragon FF, Bruno MB, Padovani CR, Okoshi K. Echocardiographic criteria for definiton of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86:432-438.
97. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi MP, Castro AV. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36:325-330.
98. Lester SJ, Tajik AJ, Nishimura RA, Oh JK, Khandheria BK, Seward JB. Unlocking the mysteries of diastolic function. Deciphering the rosetta stone 10 years later. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:679-689.

99. Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Gimenes R, Campos DHS, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, Okoshi MP, Okoshi K. Influence of physical exercise on cardiac structure and function of spontaneously hypertensive rats. *Faseb J*. 2012;26:lb496.
100. Rodrigues B, Jorge L, Mostarda CT, Rosa KT, Medeiros A, Malfitano C, de Souza AL, Jr., Viegas KA, Lacchini S, Curi R, Brum PC, De Angelis K, Irigoyen MC. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. *J Card Fail*. 2012;18:734-744.
101. Smith SA, Williams MA, Mitchell JH, Mammen PPA, Garry MG. The capsaicin-sensitive afferent neuron in skeletal muscle is abnormal in heart failure. *Circulation*. 2005;111:2056-2065.
102. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Guidelines ESCCfP. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2012;33:1787-1847.
103. 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.
104. 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;20:149-155.