

Aline Regina Ruiz Lima

Efeitos do Hormônio do Crescimento Sobre Vias de Sinalização Intracelular na Miopatia Associada à Insuficiência Cardíaca em Ratos

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. *Marina Politi Okoshi*

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

Lima, Aline Regina Ruiz.

Efeitos do hormônio do crescimento sobre vias de sinalização intracelular na miopatia associada à insuficiência cardíaca em ratos / Aline Regina Ruiz Lima. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Marina Politi Okoshi

Capes: 40101002

1. Insuficiência cardíaca. 2. Somatotropina. 3. Sistema musculoesquelético. 4. Atrofia muscular. 5. Massa muscular.

Palavras-chave: Expressão proteica; Hormônio do crescimento; Insuficiência cardíaca; Músculo esquelético; Sinalização intracelular.

Epígrafe

“Tudo vale a pena quando a alma não
é pequena.”

Fernando Pessoa

“Quanto mais acredito na ciência,
mais acredito em Deus.”

Albert Einstein

Dedicatória

À minha família aos meus amigos do
laboratório, tão amados. Sem vocês, eu
simplesmente não conseguiria.

Agradecimiento especial

Agradeço à Profa. Dra. MARINA, pela competência na orientação, paciência, dedicação, delicadeza em todos os momentos, por acreditar na minha capacidade, por confiar em meu trabalho, por seus valiosos ensinamentos... A senhora foi fundamental no meu amadurecimento científico. Muito obrigada!

Agradecimientos

À DEUS, por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, SIMÃO e REGINA, meus exemplos, pelo amor incondicional, por me proporcionarem todas as oportunidades necessárias para meu crescimento pessoal e profissional, sempre apoiando e torcendo por minha felicidade. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, FELIPE, KARLA e LÍVIA, amores da minha vida, pelo amor, pelo apoio em todas as etapas da minha vida, por serem aqueles que eu sei que sempre estarão ali. Não sou ninguém sem vocês!

À minha querida bisavó MERCEDES, a matriarca da família, que sempre me incentivou a continuar estudando e me encheu de amor e carinho.

Aos meus avós queridos RAFAEL e CIDA, por todo o amor e incentivo, sempre torcendo por mim.

À minha avó MARIA (*in memorian*), pelo carinho e por tudo o que me ensinou, coisas que entendo somente agora, mais velha e mais madura.

Ao meu querido avô MÁRIO (*in memorian*), nosso sábio, por ser tão amável, incentivador e ter preenchido nossos dias de carinho. Muitas saudades!

A todos os meus TIOS e PRIMOS, pelo afeto, alegria e apoio. Todo meu amor para vocês!

Às minhas amadas crianças TARSILA, LORENA, BIANCA e VALENTINA, que alegram meus dias, renovam minhas esperanças, me enchem de amor. Amo vocês e farei de tudo para protegê-las. E ao pequeno JOSÉ, que ainda está por vir.

A todos os meus AMIGOS queridos, em todas as cidades pelas quais passei, por terem feito parte da minha vida, fazendo de mim o que sou hoje e que, mesmo longe, estão sempre presentes.

Às minhas queridas amigas AMANDA, JULIANA e GIOVANA, que foram minha família em todos esses anos que estive aqui. Vocês são essenciais!

Às amigas NATÁLIA BARROS, THAÍS MACEDO, ANA GABRIELA, TATIANE KELLER, TATIANE BORTOLETTO, CAROLINE CAUM, PRISCILA YARA, MARIA PAULA, BIA GABRIELA e SILVANA PEDROSO, por me ajudarem a cuidar da minha saúde física e mental, deixando meus dias mais leves e alegres. Vocês farão falta!

À BOTUCATU, por me acolher, por ser o lugar onde conheci pessoas maravilhosas, vivi histórias incríveis, cresci, amadureci. Foram dez intensos anos e já sinto saudades.

Aos PROFESSORES DA UNESP DE BOTUCATU, por sempre estarem dispostos a ensinar, por terem sido verdadeiros mestres.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela fundamental participação neste e em todos os trabalhos anteriores, assim como em minha vida acadêmica, pela disponibilidade e pela gentileza com que sempre esclareceu minhas dúvidas.

À Profa. Dra. SILMÉIA GARCIA ZANATTI, pela realização do exame ecogardiográfico, por sempre ser tão amável e simpática, sempre disponível para avaliar os animais. Muito obrigada!

À Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA, pela disponibilidade e simpatia, sempre esclarecendo as dúvidas e ensinando muito do que sei sobre musculatura esquelética, por ter sido parte da banca do exame de qualificação e da defesa, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho. Desde a graduação até agora, presente em todas as etapas. Só tenho a agradecer!

Ao Prof. Dr. MARCOS MINICUCCI, pela amizade desenvolvida no laboratório, sempre alegre e simpático, e por ter sido parte da banca do exame de qualificação, tão competente, contribuindo com valiosas sugestões

para este trabalho, participando de forma tão importante na minha formação. Muito obrigada!

À Profa. Dra. PAULA S. A. GAIOLLA, por me ensinar a técnica de imunofluorescência, por ser tão paciente, acessível, simpática, pela importante participação na minha formação, sempre disposta a ensinar. Obrigada!

Ao Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, por todo cuidado que sempre demonstrou, o carinho e os constantes estímulos ao estudo e à pesquisa.

Aos PROFESSORES do Departamento de Clínica Médica, por serem sempre tão dedicados e acessíveis.

A todos os colegas da Unipex, CAMILA ROSA, CAMILA GIMENEZ, GABRIEL, RODRIGO, FELIPE, FREDERICO, MARCELA, CAMILA GARCIA, CARLA, DAVID, RAQUEL, SEFORA, ISABELA, DANI, RENATA, ANDRÉ NASCIMENTO, MIRIANE, REGIANE, BRUNA, ANDREA, FERNANDA, DANI, PAULINHA, ADRIANA, CARLOS, VANESSA, RENATA, RODRIGO, RENAN, CAROL, PAULA, ARTHUR, FABIANE, DAMIANA, JOSÉ CARLOS, MÁRIO BRUNO, IGOR, SUELI CLARA, ELENIZE, CAMILA, CORINA, ELIZETE, DE LALLA, EDUARDO, ÂNGELO, RENATA, REGINA, PAULA, REGINA, FÁTIMA, ROGÉRIO, VITOR, MARA, FLORIAN, LUCAS, DANILO, MARA, MARTA, pela colaboração na elaboração deste trabalho, convivência e bons momentos.

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

Aos queridos amigos PAULA, SILVIO, RICARDO, MARCELO, Dani Guizoni, CAMILA BONOMO, LUANA, MARIANA, MARIA TERESA, BERTHA, ANA PAULA, ANDRÉ LEOPOLDO, que conheci no laboratório, mas que levarei para toda vida. Vocês foram essenciais na elaboração deste trabalho, sempre dispostos a ajudar e ensinar. Sem vocês, certamente não conseguiria passar mais essa etapa. Vocês me ajudaram a enfrentar os momentos difíceis,

comemoram comigo as pequenas conquistas do dia-dia, deixaram mais leves os momentos de estresse. Aprendi muito com vocês e sou muito grata por tudo. Amo vocês!

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica ANA MENGUE, ALEXANDRE, BRUNO, ELISÂNGELA, LAURA, RENATO, pela dedicação e simpatia, sempre dissolvendo as dificuldades.

Ao MÁRIO, do Departamento de Clínica Médica, pela ajuda na formatação deste trabalho, pela disponibilidade, por ser tão prestativo e por sempre me receber com simpatia.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FMB, pela dedicação e simpatia, por serem muito ágeis na resolução dos problemas, por entenderem as dificuldades, os atrasos nos prazos e pela real vontade de ajudar. Vocês são ótimos!

Às MOÇAS DA LIMPEZA, por sempre manterem o laboratório e todas as dependências da faculdade asseados para podermos trabalhar e estudar com conforto.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), pelo auxílio financeiro (processo 2010/50084-5).

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

Muito obrigada!

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	6
Objetivos.....	12
3. Material e Métodos	14
4. Resultados	21
5. Discussão	65
6. Conclusões.....	72
7. Referências Bibliográficas	74

Resumo

A insuficiência cardíaca (IC) crônica é comumente associada a atrofia de músculos esqueléticos, cujos mecanismos responsáveis ainda não estão completamente esclarecidos. O hormônio do crescimento (GH) tem efeitos anabólicos. Entretanto, seus efeitos na preservação da massa muscular em doenças catabólicas ainda não são bem entendidos. O GH estimula o IGF-1 e ativa a via PI3K/Akt inibindo seus efetores atrogina-1 e MuRF-1. Além disso, pode modular a expressão dos fatores de regulação miogênica e das proteínas miostatina e follistatina e a função de células satélites. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da administração do GH sobre o trofismo e vias de sinalização intracelular envolvidas no processo de atrofia de músculos esqueléticos periféricos de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica (EAo). Após detecção clínica de IC, o GH foi administrado por 14 dias (grupo EAo-GH). Os resultados foram comparados com aqueles de grupos Sham e EAo sem tratamento. Ecocardiograma foi realizado antes e após o tratamento. O trofismo foi analisado nos músculos esqueléticos sóleo e porção branca do gastrocnêmio. A expressão proteica foi avaliada por Western blot e a ativação de células satélites por imunofluorescência. Análise estatística: ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls. Antes do tratamento, os grupos EAo apresentaram comportamento semelhante em relação às variáveis ecocardiográficas. O tratamento com GH atenuou a disfunção sistólica. A área seccional das fibras do gastrocnêmio não diferiu entre os grupos e a do sóleo foi menor nos grupos com estenose aórtica que no Sham. No gastrocnêmio, MRF4 e atrogina-1 foram aumentadas nos grupos EAo e EAo-GH. O tratamento com GH atenuou elevação da MyoD e aumentou a visualização das proteínas NCAM e isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina. No sóleo, o GH ativou as proteínas IGF-1 e PI3K. A visualização de NCAM foi aumentada nos dois grupos com estenose. Em conclusão, em ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica, o tratamento com hormônio do crescimento atenua a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo. Em músculos esqueléticos, a administração de hormônio do crescimento por 14 dias não altera o trofismo muscular. Entretanto, modula diferencialmente proteínas envolvidas na ativação de células satélites e na indução de atrofia muscular. Em músculo preferencialmente glicolítico, como o gastrocnêmio, o hormônio ativa

células satélites e atenua aumento na expressão de MyoD. Em músculo predominantemente oxidativo, como o sóleo, o hormônio do crescimento ativa as proteínas IGF-1 e PIK3.

Abstract

Although chronic heart failure is usually associated with skeletal muscle atrophy, physiopathological mechanisms involved in muscle mass loss are not completely established. Growth hormone (GH) has anabolic effects. However, its effects on skeletal muscle preservation during catabolic diseases are not well understood. GH stimulates IGF-1, which activates PI3K/Akt pathway to inhibit atrogen-1 and MuRF-1. GH can also modulate myogenic regulatory factors and myostatin and follistatin protein expression as well as satellite cells activation. In this study, we evaluated the effects of GH administration on trophicity and intracellular signaling pathways involved in the atrophy process in peripheral skeletal muscles of rats with aortic stenosis (AS)-induced heart failure. After heart failure detection, GH was administered for 14 days (AS-GH group). Results were compared with those from Sham and non-treatment AS groups. Transthoracic echocardiogram was performed before and after treatment. Trophicity was analyzed in soleus and white portion of gastrocnemius muscles. Protein expression was evaluated by Western blot and satellite cells activation by immunofluorescence. Statistical analyses: ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls. Before treatment, AS groups presented similar echocardiographic parameters. GH attenuated systolic dysfunction. Sectional fiber areas of gastrocnemius did not differ between groups; in soleus, they were lower in both AS groups than Sham. In gastrocnemius, MRF4 and atrogen-1 were higher in AS and AS-GH groups. GH treatment attenuated MyoD increase. Immunofluorescence showed that staining with anti-neural cell adhesion molecule (NCAM) and anti-neonatal myosin heavy chain isoform were statistically more intense in AS-GH than AS and Sham. In soleus, GH activated IGF-1 and PI3K proteins. NCAM immunofluorescence was increased in both AS groups. In conclusion, GH treatment attenuates left ventricular systolic dysfunction in rats with aortic stenosis-induced heart failure. GH administration for 14 days does not change skeletal muscle trophicity. However, GH differentially modulates expression of proteins involved in satellite cells activation and muscle atrophy. In muscles preferably glycolytic as gastrocnemius, GH activates satellite cells and attenuates MyoD expression increase. In muscles predominantly oxidative, as soleus, GH activates IGF-1 and PI3K proteins.

Introdução

A insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se, clinicamente, por diminuição da capacidade para exercícios físicos e atividades cotidianas devido à ocorrência precoce de fadiga e dispneia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida ¹⁻⁸. Inicialmente, considerava-se que a redução da capacidade para exercícios fosse causada por diminuição da função cardíaca e pulmonar e por alteração da perfusão tecidual decorrente de queda do débito cardíaco. Entretanto, 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 aos exercícios ⁹.

Mais recentemente, foi aventado que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética pudessem ter papel importante na capacidade para realizar exercícios físicos na insuficiência cardíaca crônica ¹⁰. Em estudos clínicos e experimentais, foram descritas diversas anormalidades da musculatura esquelética como atrofia, fibrose, perda de mitocôndrias, mudança no padrão molecular das fibras musculares, alteração na expressão de metaloproteinases e fatores de regulação miogênica, anormalidades em enzimas oxidativas e lipolíticas, e redução na capacidade de desenvolver força por unidade de área muscular ^{4, 10-19}. O conjunto das alterações musculares que ocorrem em doentes com falência cardíaca crônica foi denominado miopatia associada à insuficiência cardíaca. Estudos experimentais mostraram que as alterações podem ocorrer tanto em músculos com metabolismo oxidativo como naqueles com metabolismo glicolítico ^{14, 15, 20}. Os músculos oxidativos são constituídos predominantemente por fibras de contração lenta, como o sóleo e o extensor longo dos dedos, e os glicolíticos são constituídos predominantemente por fibras de contração rápida, como a porção branca do gastrocnêmio e o músculo plantar.

Na miopatia associada à insuficiência cardíaca, uma das alterações mais frequentemente observadas é a atrofia muscular. Em pacientes tratados ambulatorialmente, atrofia foi encontrada em 68% dos casos ⁴, principalmente em músculos dos membros inferiores ¹¹. Uma vez que a quantidade de massa muscular é intimamente relacionada à capacidade para desenvolver força, reduções da massa

têm papel importante na limitação para exercícios e atividades cotidianas. Na insuficiência cardíaca crônica, a redução da massa muscular está intimamente associada à ocorrência de caquexia cardíaca, que é preditora independente de mortalidade ^{11, 21-23}. Em nosso laboratório, observamos atrofia de músculos esqueléticos em diferentes modelos experimentais de insuficiência cardíaca ^{14, 15, 17, 24, 25}.

Somente na última década, começaram a ser melhor entendidas as vias de sinalização intracelular envolvidas na indução de atrofia em diversas condições clínicas como envelhecimento, inatividade física e doenças crônicas ²⁶⁻²⁸. Na insuficiência cardíaca, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela redução da massa muscular ainda não estão completamente esclarecidos. Diversos fatores parecem estar envolvidos como redução da atividade física e neuromuscular e ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanha o desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

Recentemente, foi relatado que a miostatina pode ter papel importante na regulação da massa muscular esquelética em diversas condições clínicas ²⁹. Previamente denominada GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8), a miostatina foi descoberta em pesquisa para identificar novos membros da superfamília TGF- β (fator transformador do crescimento- β) de fatores de diferenciação e crescimento celular ³⁰⁻³². 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 ^{31, 33-35}. A ação da miostatina pode ser modulada por várias proteínas. Uma das mais estudadas é a follistatina, que tem a propriedade de se unir à miostatina e inibir sua habilidade para se ligar aos receptores celulares. Estudos sugerem que a follistatina pode atuar como potente antagonista da miostatina e modificar sua atividade *in vivo* ³⁶⁻³⁸.

Pesquisas em músculos esqueléticos normais mostraram que, durante períodos de crescimento e/ou regeneração muscular, células precursoras mio gênicas quiescentes, entre as quais as células miossatélites, são ativadas. Estas apresentam a função de proliferação e diferenciação celular. Seus núcleos podem diferenciar-se em novos mionúcleos e incorporar-se à fibra pré-existente ou reparar

lesões da fibra muscular ³⁹. O processo de ativação, proliferação e diferenciação das células mioossatélites é modulado pelos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 ⁴⁰. A deficiência na proliferação e diferenciação das células mioossatélites dificulta a regeneração e induz atrofia muscular. Estudos sugerem que a miostatina possa modular a expressão dos fatores regulatórios músculo específicos, principalmente MyoD e miogenina ⁴⁰.

Poucos autores avaliaram a via miostatina/folistatina na insuficiência cardíaca. Em ratos com fístula arterio-venosa ou infarto do miocárdio, a expressão gênica e proteica da miostatina encontra-se aumentada em músculos esqueléticos ⁴¹⁻⁴³. Em nosso laboratório, verificamos que ratos com insuficiência cardíaca crônica apresentam atrofia do músculo sóleo na ausência de alterações da expressão gênica e proteica da miostatina. Entretanto, a expressão proteica da folistatina foi reduzida ^{17, 24}. Como a folistatina é antagonista da miostatina, sua redução pode ter colaborado para aumentar a atividade da miostatina e induzir atrofia muscular.

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio anabólico capaz de aumentar a massa muscular ⁴⁴. Além de induzir hipertrofia, o GH pode modular a diferenciação, proliferação e sobrevivência de células musculares. Seus efeitos ocorrem tanto por ação direta, como mediada pelo fator de crescimento insulina símile (IGF-1), cujos níveis circulantes podem ser elevados pela administração de GH ⁴⁵⁻⁴⁸. A ação hipertrófica do GH foi bem demonstrada em diferentes modelos experimentais como hipofisectomia e imobilização de membros ⁴⁹⁻⁵².

Os mecanismos pelos quais o GH preserva a massa muscular em condições patológicas ainda não estão completamente esclarecidos ⁵³. O IGF-1 estimula fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) e ativa Akt serina/treonina quinase, que é considerada um dos principais reguladores do crescimento muscular ²⁸. Na última década, foi demonstrado o importante papel da via IGF-1/PI3K/Akt na preservação da massa e hipertrofia muscular ⁵⁴⁻⁵⁶. Em cultura de células, inibição da atividade da PI3K e da Akt leva a diminuição do tamanho celular. A alteração fenotípica parece ser dependente de ativação de proteínas da família forkhead box O (FOXO) que, sem estimulação da Akt, se torna fortemente localizada no núcleo, aumentando a expressão da atrogina-1 e muscle ring-finger protein (MuRF)-1 ^{28, 57}. A atrogina-1 é potente indutora de proteólise e, juntamente com o MuRF-1, atua

na ubiquitinação de proteínas nucleares e indução de atrofia celular ^{28, 56, 58}. Por outro lado, ativação da PIK3 e Akt parece inibir a atrogina-1 ²⁸.

Outro mecanismo pelo qual o IGF-1 pode atuar na preservação do trofismo muscular é por modulação de células satélites. As células satélites são mononucleadas e indiferenciadas, e se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular ⁵⁹⁻⁶¹. Em condições basais, encontram-se em estado quiescente; sua ativação ocorre após estímulos lesivos ao músculo, sendo denominadas células precursoras miogênicas ou mioblastos ^{62, 63}. O IGF-1 pode estimular a proliferação e diferenciação dessas células. As pesquisas em células satélites tiveram grande avanço após a descoberta de marcadores moleculares que permitem sua identificação ⁶⁴. “Paired box”, ou Pax, é uma família de fatores transcricionais que desempenha papel essencial durante o desenvolvimento embriogênico ⁶⁴. Em mamíferos, são conhecidos nove genes Pax, que são divididos em quatro subgrupos de acordo com sua estrutura genômica, similaridade de sequência e função ⁶⁵. Acredita-se que o Pax-7 seja necessário para o crescimento e reparo de fibras musculares. Embora pareça atuar como sinal de sobrevivência e proliferação de células satélites, sua expressão deve estar inibida para que ocorra o processo de diferenciação miogênica. Atualmente, a expressão do Pax-7 tem sido avaliada como marcador de ativação de células satélites ⁶⁴. Além do Pax-7, outros genes como Notch ⁶⁶, molécula de adesão de células neurais (NCAM), Myf5 e MyoD ^{62, 67-70} têm sua expressão elevada durante ativação e proliferação de células satélites. Adicionalmente, células musculares em regeneração expressam miosina de cadeia pesada (MyHC) neonatal, o que também constitui bom marcador de regeneração muscular.

Finalmente, outros mecanismos envolvidos na preservação da massa muscular via GH/IGF-1 são a inibição de apoptose, causada pelo IGF-1 ^{71, 72}, e o antagonismo da sinalização por membros da família TGF- β , estimulado pelo GH ⁷³⁻⁷⁵.

Embora estudos em humanos com insuficiência cardíaca tenham mostrado resultados controversos ⁷⁶⁻⁷⁹, as ações periféricas do GH sugerem seu potencial para modular beneficemente a estrutura e função muscular durante a insuficiência cardíaca crônica. Entretanto, poucos autores avaliaram os efeitos do

GH sobre a musculatura esquelética na insuficiência cardíaca. Em modelo experimental de insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina, o tratamento com GH preveniu atrofia, apoptose e mudança no padrão das fibras musculares, comumente observada na insuficiência cardíaca^{72,80}. Em estudo prévio, observamos que, em ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica, a administração de GH preservou o trofismo muscular e atenuou fibrose intersticial no músculo sóleo. Adicionalmente, a expressão gênica da MyoD foi aumentada em relação aos animais com insuficiência cardíaca sem tratamento¹⁸. Embora o aumento da MyoD sugira que o GH possa ter induzido proliferação de células satélites, a ativação destas células não foi avaliada no estudo. Não identificamos na literatura estudos que tenham avaliado os efeitos da administração de GH sobre músculos esqueléticos de metabolismo predominantemente glicolítico, de contração rápida, como o gastrocnêmio.

Neste trabalho procuramos elucidar se a administração de GH preserva o trofismo de diferentes tipos de músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica, e identificar vias de sinalização intracelular envolvidas nas ações musculares do GH.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da administração do hormônio do crescimento sobre aspectos morfológicos e vias de sinalização intracelular envolvidas no processo de atrofia de músculos esqueléticos periféricos de ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por estenose aórtica.

Objetivos específicos

1. Avaliar morfometricamente a área seccional de miócitos dos músculos esqueléticos sóleo e porção branca do gastrocnêmio;
2. Determinar a expressão proteica dos fatores de regulação miogênica na musculatura esquelética;
3. Quantificar as proteínas da via IGF-1/PIK3/Akt e seus efetores atrogina-1 e MuRF-1 e da via miostatina/folistatina;
4. Identificar ativação de células satélite por análise da expressão proteica do Pax-7 e por avaliação por imunofluorescência de MyoD, NCAM e isoforma neonatal das cadeias pesadas de miosina;
5. Verificar se o tratamento com o hormônio do crescimento atenua ou previne atrofia muscular e se este potencial efeito benéfico é mediado pelas vias de sinalização intracelular avaliadas.

Material e Métodos

Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 90 a 100 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum*, e mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C), com ciclos de luminosidade de 12 h.

Para a indução da estenose aórtica, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg intramuscular) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg intramuscular) e submetidos a toracotomia mediana. A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado a aproximadamente 3 mm da raiz da aorta⁸¹. Durante a cirurgia, os ratos foram ventilados manualmente a pressão positiva. Os animais pertencentes ao grupo controle, denominado Sham, foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe.

Em estudos prévios, observamos que ratos com estenose aórtica apresentam insuficiência cardíaca cerca de 18 a 28 semanas após o procedimento cirúrgico^{14, 81, 82}. Portanto, 18 semanas após a cirurgia, os ratos com estenose aórtica foram observados duas vezes por semana para detecção de sinais clínicos de insuficiência cardíaca como taquipneia/respiração laboriosa e perda de peso⁸³. Após o encontro dos sintomas, foi realizada avaliação estrutural cardíaca e funcional do ventrículo esquerdo, por meio de ecocardiograma transtorácico, para determinar o grau de comprometimento cardíaco decorrente da estenose aórtica. A seguir, os animais foram randomizados em dois grupos: estenose aórtica (EAo) e estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento (EAo-GH).

O grupo EAo-GH recebeu GH recombinante humano diariamente em injeções subcutâneas na dose de 2 mg/kg/dia¹⁸ e o grupo EAo recebeu apenas veículo por 14 dias. Ao final do período experimental, para cada animal dos grupos EAo e EAo-GH eutanasiado, foi também eutanasiado um animal do grupo Sham de mesma idade.

Estudos prévios de nosso laboratório mostraram que a constituição de grupos experimentais com 10 a 20 animais é adequada para estudos morfológicos e moleculares dos músculos esqueléticos e para avaliação estrutural e funcional do ventrículo esquerdo (VE) ^{14, 16, 17, 24, 25, 84, 85}. Como a mortalidade após indução de estenose aórtica é cerca de 40% a 50% (dados não publicados de nosso laboratório), cada grupo foi composto, inicialmente, por 17 ratos.

Durante a eutanásia, foram avaliados os seguintes sinais clínico e anátomo-patológicos de insuficiência cardíaca: taquipneia/respiração laboriosa, 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) ⁸⁶.

Avaliação ecocardiográfica

Antes e após tratamento com GH, as estruturas cardíacas e a função do VE foram avaliadas por ecocardiografia transtorácica. Após anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intramuscular, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma. 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 estruturais e funcionais foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório ⁸⁷⁻⁸⁹. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. As seguintes estruturas foram avaliadas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (Esp.

Rel. VE) foi calculada segundo a fórmula: $\text{Esp. Rel. VE} = 2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Endo): $(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Meso): $(\text{DDVE} + \frac{1}{2} \text{EDPP} + \frac{1}{2} \text{EDSIV}) - (\text{DSVE} + \frac{1}{2} \text{ESPP} + \frac{1}{2} \text{ESSIV}) / (\text{DDVE} + \frac{1}{2} \text{EDPP} + \frac{1}{2} \text{EDSIV})$; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn).

Coleta dos tecidos para análise

A eutanásia e coleta de tecidos foram realizadas na Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (UNIPEX). Os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Os ratos foram eutanasiados por decapitação e o sangue coletado em tubo heparinizado e centrifugado a 4 °C. Amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C. O coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios foram removidos e os ventrículos direito e esquerdo pesados separadamente. A seguir, o tecido epitelial dos membros pélvicos foi removido e os músculos sóleo e a porção branca do gastrocnêmio foram dissecados. Imediatamente após, as amostras musculares foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C.

Análise Histológica

O trofismo muscular foi avaliado por análise morfométrica. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram,

então, fixados em suportes metálicos do cristato (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. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina. A área seccional das fibras musculares foi avaliada utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Em cada lâmina, foi efetuada a mensuração de pelo menos vinte diferentes campos histológicos. Todas as análises histológicas foram realizadas por um mesmo examinador cego ao tratamento.

Imunofluorescência

Seções transversais obtidas em criostato dos músculos sóleo e gastrocnêmio foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salino (PBS) por 10 min à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas em PBS, bloqueadas em solução PBS-albumina bovina (BSA) 5%-Triton X-100 por 10 min e bloqueadas novamente em PBS-BSA 5% por 20 min. As lâminas foram, então, incubadas durante a noite com solução contendo anticorpo primário (anti-NCAM, H-300 sc-10735; anti-MyoD, M-318 sc-760; e anti-miosina neonatal, N1.551 sc-53097; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído em PBS, a 4 °C. Após lavagens em PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário em PBS, por uma h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, para corar os núcleos celulares, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com DAPI. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e as lamínulas foram alocadas utilizando-se ProLong® Gold Antifade reagent (Molecular Probes® by Life Technologies). As lâminas foram analisadas em microscópio específico para detecção de imunofluorescência (Olympus BX51, equipado com emissor de fluorescência Olympus U-RFL-T e câmera Olympus DP72, Panasonic).

Em cada amostra, foram avaliados 10 campos histológicos ⁹⁰. As reações de imunofluorescência foram analisadas quanto à intensidade de marcação de acordo com escores pré-estabelecidos: +++ fortemente marcado, ++ moderadamente marcado, + fracamente marcado e - ausência de marcação.

Expressão proteica

A expressão proteica dos fatores de regulação miogênica (MyoD, M-318 sc-760; miogenina, myogenin M-225 sc-576e; MRF4, Myf-6 C-19 sc-301), do IGF-1 (H-70 sc-9013), das proteínas relacionadas às vias de indução de atrofia (PI3K, PI 3-kinase p85 α B-9 sc-1637; p-PI3K, p-PI 3-kinase p85 α (Tyr 467) sc-293115; Akt, Akt1 G-5 sc-55523; atrogina-1, MAFbx H-300 sc-33782; MuRF-1, H-145 sc-32920; miostatina, GDF-8 N-19-R sc-6885-R; e folistatina, follistatin H-114 sc-30194), e do Pax-7 (Pax-3/7 H-208 sc-25409; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) foi avaliada por Western blot ^{56, 91-96}. A proteína muscular foi extraída em tubo contendo tampão RIPA e o conteúdo de proteínas do sobrenadante foi quantificado 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 a incubação com anticorpos primários durante a noite, a 4 °C. A membrana foi, então, lavada com PBS e Tween 20 e incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase, por 90 min à temperatura ambiente. A seguir, foi lavada com PBS e Tween 20. Os anticorpos foram, então, removidos utilizando-se Restore Solution (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e a membrana novamente incubada com anticorpo anti-GAPDH (6C5 sc-32233, Santa Cruz Biotechnology). Os sinais foram visualizados com auxílio de kit para quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e analisador de imagens (Gel Logic 6000 Pro, Carestream Health Inc., Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, USA).

Análise estatística

A comparação entre os três grupos foi realizada pelo método de análise de variância de uma via (ANOVA), complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, para dados paramétricos. Para os dados não-paramétricos, foi utilizado o método de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Student-Newman-Keuls. 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%.

Resultados

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

Ao final do período experimental, o grupo Sham foi formado por 17 animais, o grupo EAo por 13 e o grupo EAo-GH por 10 ratos. No grupo EAo, 12 animais apresentaram taquipneia/dispneia, 8 tiveram ascite, 7 derrame pleuripericárdico, 6 trombos em átrio esquerdo, 13 hipertrofia do ventrículo direito, e 12 congestão pulmonar. No grupo EAo-GH, 8 ratos apresentaram taquipneia/dispneia, 4 tiveram ascite, 7 derrame pleuripericárdico, 7 trombos em átrio esquerdo, 6 hipertrofia do ventrículo direito, e 8 congestão pulmonar. A frequência dos sinais de insuficiência cardíaca não diferiu entre os grupos. As variáveis anatômicas estão expostas na Tabela 1.

Avaliação ecocardiográfica

Antes do tratamento, os grupos com EAo apresentaram comportamento semelhante para as variáveis ecocardiográficas estudadas, exceto pela espessura sistólica do septo interventricular, que foi maior no grupo EAo-GH que no EAo (Tabelas 2 e 3).

Ao final do período experimental, foi realizado novo estudo ecocardiográfico; as variáveis estruturais estão apresentadas na Tabela 4. O peso corporal foi menor no grupo EAo que nos grupos Sham e EAo-GH. O diâmetro diastólico do VE normalizado pelo peso corporal foi maior no grupo EAo que nos grupos Sham e EAo-GH e não diferiu entre Sham e EAo-GH. As espessuras sistólica e diastólica da parede posterior e do septo interventricular, e o diâmetro do átrio esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal ou pelo diâmetro da aorta, foram maiores nos grupos com estenose aórtica que no Sham. A espessura sistólica do septo interventricular manteve-se maior no grupo EAo-GH que no EAo.

As variáveis funcionais do VE estão apresentadas na Tabela 5. A porcentagem de encurtamento endocárdico foi menor no grupo EAo em comparação aos outros grupos e a porcentagem de encurtamento mesocárdico foi menor no grupo EAo que no Sham. A velocidade de encurtamento da parede

posterior, a onda A mitral, o tempo de desaceleração da onda E e o tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca foram menores nos grupos com estenose em relação ao Sham. A onda E e a relação E/A foram maiores nos grupos com estenose aórtica que no Sham.

Análise histológica

A Figura 1 ilustra cortes histológicos transversos das fibras musculares corados por hematoxilina e eosina. No músculo gastrocnêmio, a área seccional não diferiu entre os grupos (Sham 3.529 ± 353 ; EAo 3.194 ± 433 ; EAo-GH $3.566 \pm 388 \mu\text{m}^2$; $p=0,138$; Figura 2). No músculo sóleo, a área seccional foi menor nos grupos EAo que no Sham (Sham 3.556 ± 447 ; EAo 2.882 ± 422 ; EAo-GH $2.868 \pm 591 \mu\text{m}^2$; $p=0,016$; Figura 3).

Imunofluorescência

No músculo gastrocnêmio, o grupo Sham não apresentou marcação para a proteína NCAM. A marcação foi estatisticamente maior nos grupos com estenose que no Sham e no EAo-GH que no EAo [Sham 0,00; EAo 1,00 (1,00-1,00); EAo-GH 2,50 (1,50-3,00) unidades arbitrárias; $p<0,001$; Figuras 4 e 5]. A marcação da proteína MyoD não diferiu entre os grupos [Sham 1,00 (0,50-1,50); EAo 1,00 (0,50-2,00); EAo-GH 0,00 (0,00-2,00) unidades arbitrárias; $p=0,622$; Figura 6]. A isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina não apresentou marcação no Sham e foi mais fortemente marcada no EAo-GH que nos outros grupos [Sham 0,00; EAo 0,00 (0,00-1,00); EAo-GH 1,00 (1,00-2,00) unidades arbitrárias; $p=0,009$; Figuras 7 e 8].

No músculo sóleo, a proteína NCAM foi mais fortemente marcada nos dois grupos com estenose aórtica que no Sham (Sham $0,50 \pm 0,76$; EAo $2,25 \pm 1,04$; EAo-GH $3,38 \pm 0,92$; unidades arbitrárias; $p<0,001$; Figuras 9 e 10). As marcações das proteínas MyoD e miosina neonatal não diferiram entre os grupos [MyoD: Sham 1,00 (0,00-2,00); EAo 2,50 (2,00-3,00); EAo-GH 2,50 (1,00-3,50) unidades

arbitrárias; $p=0,137$; Figura 11; miosina neonatal: Sham 0,00; EAo 0,50 (0,00-1,00); EAo-GH 0,50 (0,00-2,00) unidades arbitrárias; $p=0,186$; Figura 12].

Expressão proteica

No músculo gastrocnêmio, a expressão da MyoD foi maior no grupo EAo que no Sham e não diferiu entre EAo-GH e Sham (Sham $1,00 \pm 1,28$; EAo $1,71 \pm 1,37$; EAo-GH $1,21 \pm 1,21$ unidades arbitrárias; $p=0,015$, Figura 13). A expressão da miogenina não diferiu entre os grupos [Sham 0,75 (0,007-1,999); EAo 0,49 (0,009-1,111); EAo-GH 0,593 (0,015-2,745) unidades arbitrárias; $p=0,432$; Figura 14]. MRF4 foi maior nos grupos EAo e EAo-GH que no Sham [Sham 0,90 (0,71-1,29); EAo 2,25 (1,28-2,82); EAo-GH 3,00 (1,59-7,81) unidades arbitrárias; $p=0,005$; Figura 15]. IGF-1 não diferiu entre os grupos (Sham $1,00 \pm 0,44$; EAo $0,73 \pm 0,19$; EAo-GH $0,92 \pm 0,18$ unidades arbitrárias; $p=0,202$; Figura 16). A expressão de p-PI3K e PI3K não diferiu entre os grupos (p-PI3K/PI3K: Sham $1,00 \pm 0,72$; EAo $1,31 \pm 0,37$; EAo-GH $1,39 \pm 0,80$ unidades arbitrárias; $p=0,231$; PI3K: Sham $1,00 \pm 0,56$; EAo $1,42 \pm 0,65$; EAo-GH $1,34 \pm 1,41$ unidades arbitrárias; $p=0,515$; Figura 17). As proteínas Akt e MuRF-1 não diferiram entre os grupos [Akt: Sham $1,00 \pm 0,45$; EAo $1,03 \pm 0,37$; EAo-GH $0,94 \pm 0,46$ unidades arbitrárias; $p=0,907$; Figura 18; MuRF-1: Sham 0,46 (0,34-1,33); EAo 0,89 (0,86-1,15); EAo-GH 0,46 (0,15-1,15) unidades arbitrárias; $p=0,30$; Figura 19]. A atrogina-1 foi maior nos grupos EAo e EAo-GH que no Sham [Sham 0,73 (0,61-1,34); EAo 2,98 (1,58-5,01); EAo-GH 3,21 (2,36-4,62) unidades arbitrárias; $p=0,009$; Figura 20]. A expressão da miostatina (Sham $1,00 \pm 0,63$; EAo $0,80 \pm 0,31$; EAo-GH $0,87 \pm 0,44$ unidades arbitrárias; $p=0,696$; Figura 21) e da follistatina (Sham $1,00 \pm 0,54$; EAo $1,39 \pm 0,25$; EAo-GH $1,09 \pm 0,36$ unidades arbitrárias; $p=0,156$; Figura 22) não diferiu entre os grupos. A expressão de Pax-7 não diferiu entre os grupos [Sham 0,99 (0,76-1,16); EAo 0,68 (0,61-0,83); EAo-GH 0,75 (0,32-0,84) unidades arbitrárias; $p=0,09$; Figura 23].

No músculo sóleo, a expressão das proteínas MyoD, miogenina e MRF4 não diferiu entre os grupos [MyoD: Sham 1,04 (0,88-1,13); EAo 1,10 (0,90-1,42); EAo-GH 1,47 (1,11-1,79) unidades arbitrárias; $p=0,194$; Figura 24; miogenina:

Sham $1,00 \pm 0,38$; EAo $0,58 \pm 0,36$; EAo-GH $0,87 \pm 0,68$ unidades arbitrárias; $p=0,223$; Figura 25; MRF4: Sham $0,88$ ($0,62-1,35$); EAo $0,60$ ($0,34-1,19$); EAo-GH $1,33$ ($0,79-3,27$) unidades arbitrárias; $p=0,110$; Figura 26]. O IGF-1 foi maior no EAo-GH que nos outros grupos (Sham $1,00 \pm 0,25$; EAo $0,96 \pm 0,46$; EAo-GH $1,67 \pm 0,45$ unidades arbitrárias; $p=0,004$; Figura 27). A expressão de p-PI3K/GAPDH foi maior nos grupos EAo e EAo-GH que no Sham e o PI3K total foi maior no EAo-GH que no Sham [p-PI3K/GAPDH: Sham $0,94$ ($0,74-1,28$); EAo $3,99$ ($3,01-5,46$); EAo-GH $3,71$ ($1,97-9,62$) unidades arbitrárias; $p=0,004$; PI3K: Sham $0,98$ ($0,63-1,32$); EAo $1,26$ ($1,00-2,51$); EAo-GH $2,51$ ($2,07-6,05$) unidades arbitrárias; $p=0,037$; Figura 28]. As demais proteínas não diferiram entre os grupos (Akt: Sham $1,00 \pm 0,54$; EAo $0,86 \pm 0,35$; EAo-GH $0,86 \pm 0,54$ unidades arbitrárias; $p=0,806$; Figura 29; atrogina-1: Sham $1,00 \pm 0,44$; EAo $0,73 \pm 0,19$; EAo-GH $0,92 \pm 0,18$ unidades arbitrárias; $p=0,324$; Figura 30; MuRF-1: Sham $1,00 \pm 0,90$; EAo $0,53 \pm 0,41$; EAo-GH $0,63 \pm 0,23$; $p=0,305$; Figura 31; miostatina: Sham $1,00 \pm 0,32$; EAo $1,86 \pm 1,09$; EAo-GH $2,05 \pm 1,07$; unidades arbitrárias; $p=0,096$; Figura 32; folistatina: Sham $1,00 \pm 1,11$; EAo $1,42 \pm 0,83$; EAo-GH $1,31 \pm 1,44$; $p=0,730$; Figura 33; Pax-7: Sham $1,00 \pm 0,39$; EAo $1,06 \pm 0,63$; EAo-GH $0,74 \pm 0,63$ unidades arbitrárias; $p=0,557$; Figura 34).

Tabela 1. Variáveis anatômicas

Variáveis	Sham (n=17)	EAo (n=13)	EAo-GH (n=10)
PC (g)	484 ± 42	415 ± 31*	476 ± 58#
VE (g)	0,839 ± 0,116	1,218 ± 0,257*	1,419 ± 0,244*
VD (g)	0,292 ± 0,056	0,499 ± 0,089*	0,601 ± 0,102*#
Átrios (g)	0,094 ± 0,016	0,330 ± 0,097*	0,386 ± 0,064*
Sóleo (g)	0,234 ± 0,030	0,189 ± 0,021*	0,209 ± 0,035
Gastrocnêmio (g)	2,783 ± 0,252	2,413 ± 0,219*	2,595 ± 0,315
VE/PC (mg/g)	1,733 ± 0,172	2,932 ± 0,567*	2,913 ± 0,460*
VD/PC (mg/g)	0,608 ± 0,134	1,204 ± 0,221*	1,234 ± 0,192*
Átrios/PC (mg/g)	0,195 ± 0,028	0,796 ± 0,233*	0,790 ± 0,106*
Pulmão (g)	2,167 ± 0,498	3,521 ± 0,757*	3,936 ± 1,178*
Pulmão/PC (mg/g)	4,528 ± 1,252	8,532 ± 1,956*	8,117 ± 2,739*

EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão; * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs EAo; ANOVA e Tukey.

Tabela 2. Análise ecocardiográfica pré-tratamento de variáveis cardíacas estruturais

Variáveis	Sham (n=17)	EAo (n=13)	EAo-GH (n=10)
PC (g)	508,4 ± 41,1	451,7 ± 89,7	466,7 ± 59,5
DDVE (mm)	8,08 ± 0,45	8,51 ± 1,10	8,64 ± 0,82
DDVE/PC (mm/kg)	15,98 ± 1,21	19,29 ± 3,70*	18,69 ± 1,98*
DSVE (mm)	3,77 ± 0,47	4,07 ± 1,24	3,86 ± 0,90
EDPP (mm)	1,47 ± 0,09	2,25 ± 0,34*	2,46 ± 0,24*
ESPP (mm)	2,98 ± 0,21	3,98 ± 0,34*	4,37 ± 0,72*
ESSIV (mm)	2,80 ± 0,19	3,05 ± 0,26*	3,44 ± 0,30*#
EDSIV (mm)	1,48 ± 0,08	2,26 ± 0,34*	2,48 ± 0,26*
AO (mm)	3,80 ± 0,21	3,91 ± 0,27	3,93 ± 0,37
AE (mm)	4,99 ± 0,34	7,82 ± 1,08*	7,72 ± 0,87*
AE/AO	1,32 ± 0,15	2,00 ± 0,28*	1,97 ± 0,21*
AE/PC (mm/kg)	9,88 ± 1,07	17,79 ± 3,73*	16,68 ± 1,93*
Esp Rel VE	0,35±0,03	0,52±0,11*	0,53±0,04*

EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; PC: peso corporal; EDPP e ESPP: espessuras diastólica e sistólica da parede posterior do VE, respectivamente; EDSIV e ESSIV: espessuras diastólica e sistólica do septo interventricular, respectivamente; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Esp Rel VE: espessura relativa da parede do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão; * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs EAo; ANOVA e Tukey.

Tabela 3. Avaliação ecocardiográfica pré-tratamento de variáveis funcionais do ventrículo esquerdo

Variáveis	Sham (n=17)	EAo (n=13)	EAo-GH (n=10)
FC (bpm)	287 ± 41	299 ± 34	299 ± 40
Δ Endo (%)	53,4 ± 4,4	53,0 ± 9,5	55,5 ± 8,5
Δ Meso (%)	30,3 ± 3,1	28,7 ± 4,3	29,5 ± 3,9
VEPP (mm/s)	37,0 ± 2,5	27,8 ± 4,6*	28,7 ± 6,3*
Onda E	73,2 ± 7,0	140,7 ± 13,8*	121,7 ± 17,5*
Onda A	47,5 ± 6,7	34,3 ± 23,4*	25,1 ± 6,0*
E/A	1,58 ± 0,35	4,86 ± 1,31*	5,25 ± 2,03*
TDE (ms)	50,1 ± 6,9	33,2 ± 8,4*	33,9 ± 10,6*
TRIV (ms)	31,06±5,44	24,08±7,61*	20,57±6,32*
TRIVn (ms)	33,1 ± 4,4	23,0 ± 4,7*	19,3 ± 5,2*

EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; Δ Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; Δ Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão; * p<0,05 vs Sham; ANOVA e Tukey.

Tabela 4. Análise ecocardiográfica pós-tratamento de variáveis cardíacas estruturais

Variáveis	Sham (n=15)	EAo (n=13)	EAo-GH (n=08)
PC (g)	484 ± 42	415 ± 31*	476 ± 58#
DDVE (mm)	7,73 ± 0,53	7,93 ± 1,42	7,98 ± 1,02
DDVE/PC (mm/kg)	15,54 ± 1,45	18,47 ± 3,20*	16,53 ± 3,62#
DSVE (mm)	3,16 ± 0,51	4,08 ± 1,74	3,20 ± 0,91
EDPP (mm)	1,43 ± 0,09	2,25 ± 0,25*	2,41 ± 0,37*
ESPP (mm)	3,03 ± 0,21	3,79 ± 0,48*	4,33 ± 0,63*
ESSIV (mm)	2,80 ± 0,19	3,05 ± 0,26*	3,44 ± 0,30*#
EDSIV (mm)	1,45 ± 0,08	2,26 ± 0,24*	2,40 ± 0,35*
AO (mm)	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,2*	4,0 ± 0,2
AE (mm)	4,9 ± 0,2	7,0 ± 0,8*	7,8 ± 1,2*
AE/AO	1,28 ± 0,06	1,74 ± 0,19*	1,92 ± 0,30*
AE/PC (mm/kg)	9,89 ± 0,79	16,22 ± 1,68*	15,87 ± 2,08*
Esp Rel VE	0,37±0,03	0,58±0,10*	0,62±0,16*

EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; PC: peso corporal; EDPP e ESPP: espessuras diastólica e sistólica da parede posterior do VE, respectivamente; EDSIV e ESSIV: espessuras diastólica e sistólica do septo interventricular, respectivamente; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Esp Rel VE: espessura relativa da parede do VE. Dados expressos em média ± desvio padrão; * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs EAo; ANOVA e Tukey.

Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica pós-tratamento de variáveis funcionais do ventrículo esquerdo

Variáveis	Sham (n=15)	EAo (n=13)	EAo-GH (n=08)
FC (bpm)	303 ± 43	298 ± 27	308 ± 21
Δ Endo (%)	59,1 ± 5,6	49,8 ± 14,7*	59,8 ± 12,1#
Δ Meso (%)	32,8 ± 3,2	26,6 ± 7,9*	31,6 ± 6,3
VEPP (mm/s)	38,6 ± 7,2	25,2 ± 5,1*	25,6 ± 3,1*
Onda E	74,2 ± 8,5	132,4 ± 15,7*	121,1 ± 19,0*
Onda A	54,5 ± 15,9	26,0 ± 5,0*	22,6 ± 5,8*
E/A	1,45 ± 0,37	5,23 ± 0,97*	5,59 ± 1,31*
TDE (ms)	52,6 ± 4,3	32,7 ± 4,8*	29,0 ± 5,9*
TRIV (ms)	33,12±4,18	23,57±4,70*	21,31±5,77*
TRIVn (ms)	33,9 ± 4,3	22,9 ± 5,0*	21,4 ± 5,5*

EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais; FC: frequência cardíaca; Δ Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; Δ Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Dados expressos em média ± desvio padrão; * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs EAo; ANOVA e Tukey.

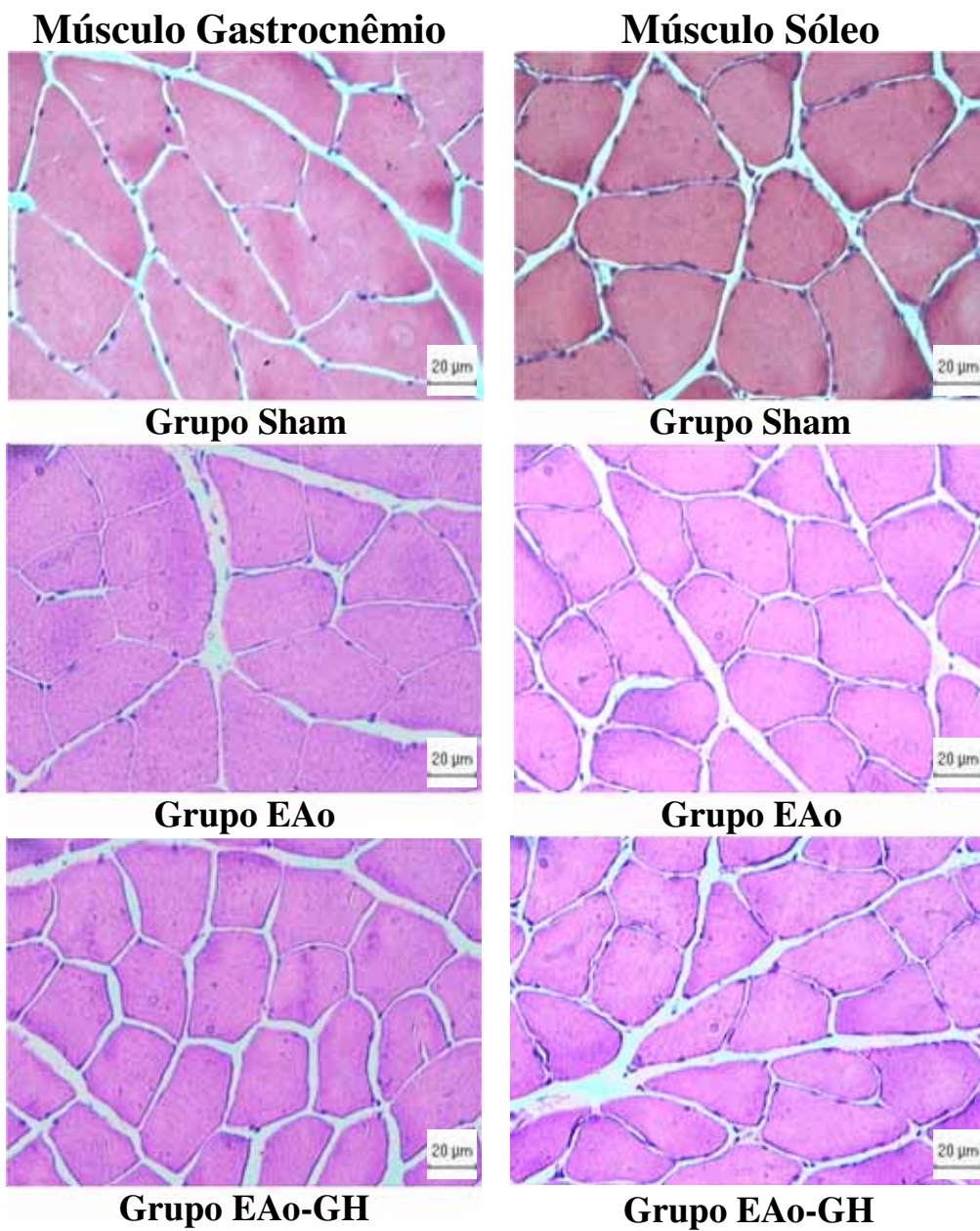


Figura 1. Fotomicrografia de lâminas histológicas dos músculos gastrocnêmio e sóleo coradas por hematoxilina-eosina. EAO: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAO-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento.

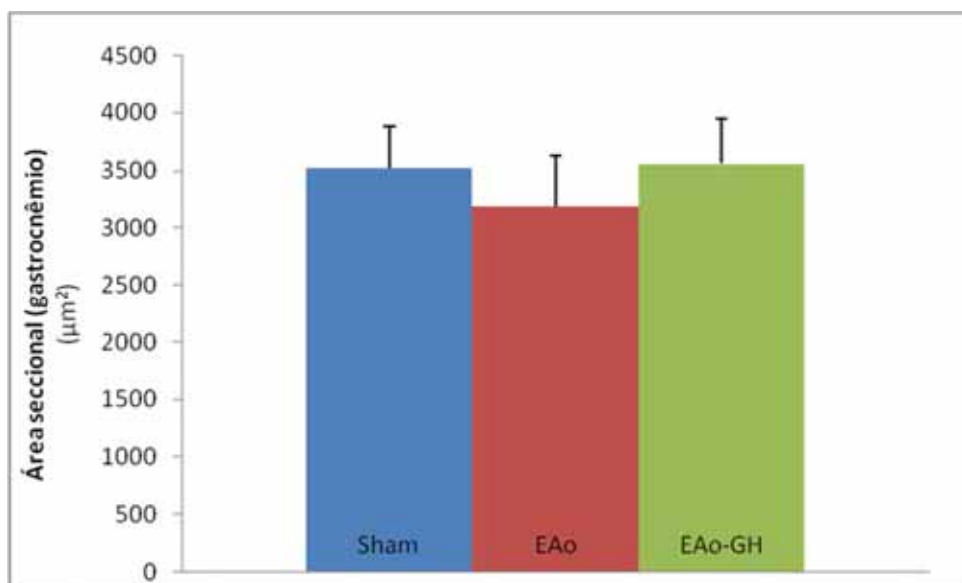


Figura 2. Área seccional transversa das fibras musculares do músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA; $p=0,138$.

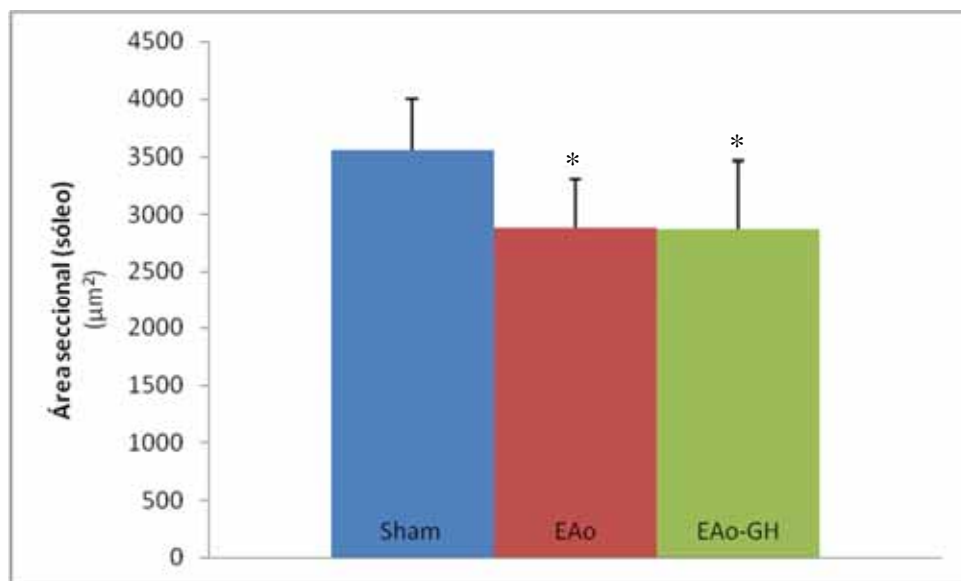


Figura 3. Área seccional transversa das fibras musculares do músculo soléo. EAO: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAO-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ vs Sham; ANOVA e Tukey.

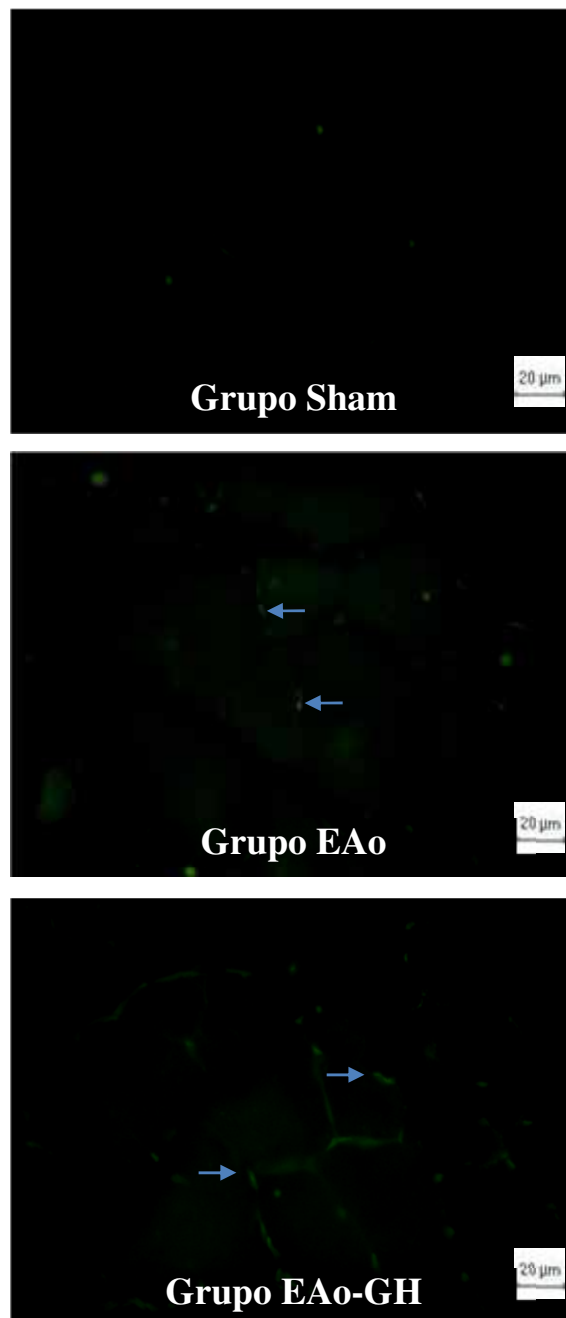


Figura 4. Fotomicrografia de fluorescência para a proteína NCAM no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento.

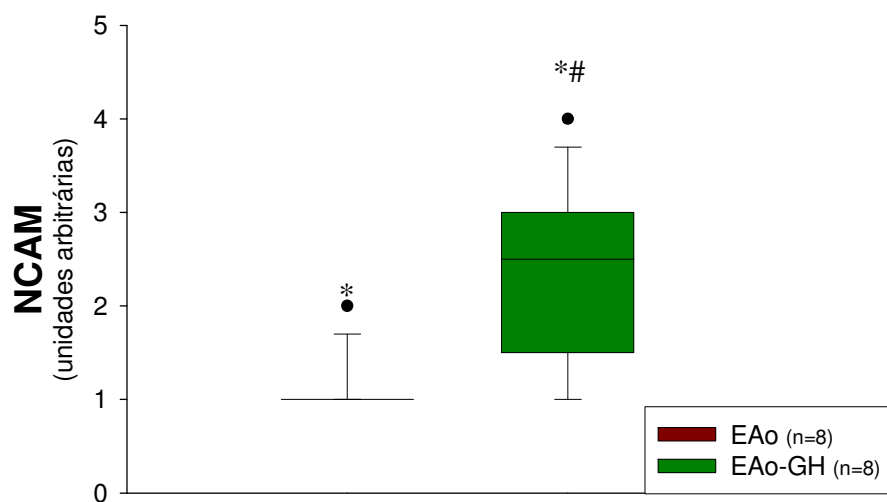


Figura 5. Análise de imunofluorescência para a proteína NCAM no músculo gastrocnêmio. EAO: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAO-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs EAO. Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

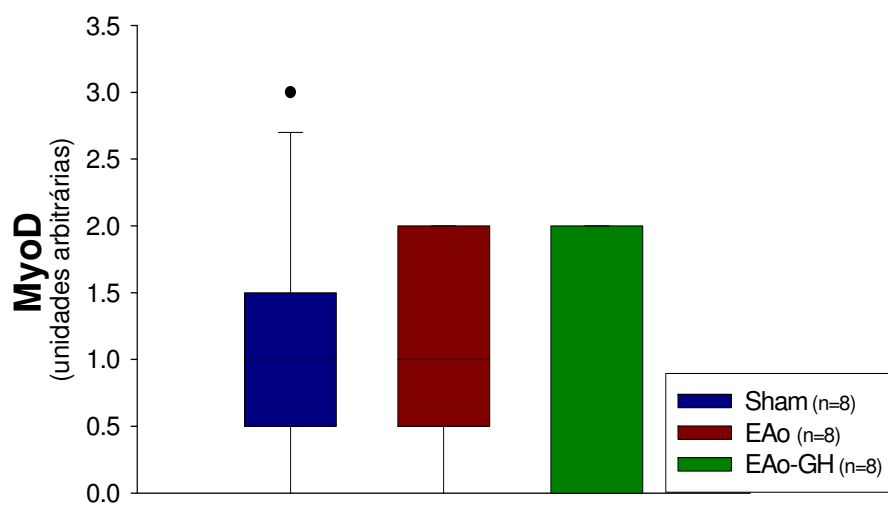


Figura 6. Análise de imunofluorescência para a proteína MyoD no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis. Kruskal-Wallis.

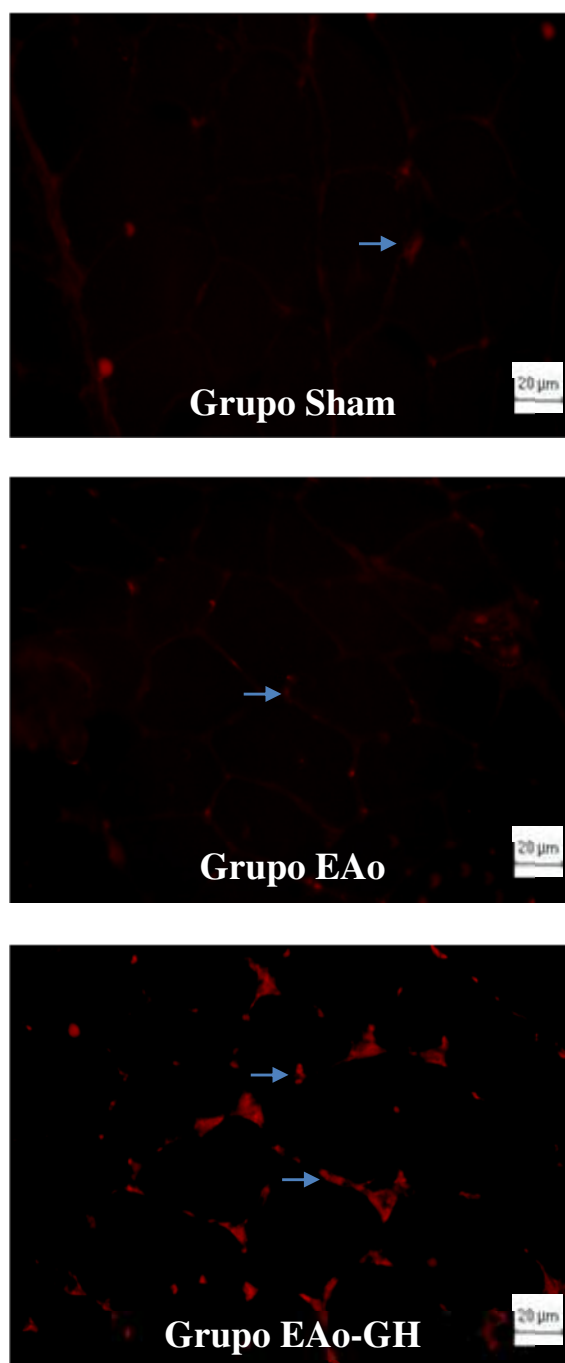


Figura 7. Fotomicrografia de fluorescência para a isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina no músculo gastrocnêmio. EAO: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAO-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento.

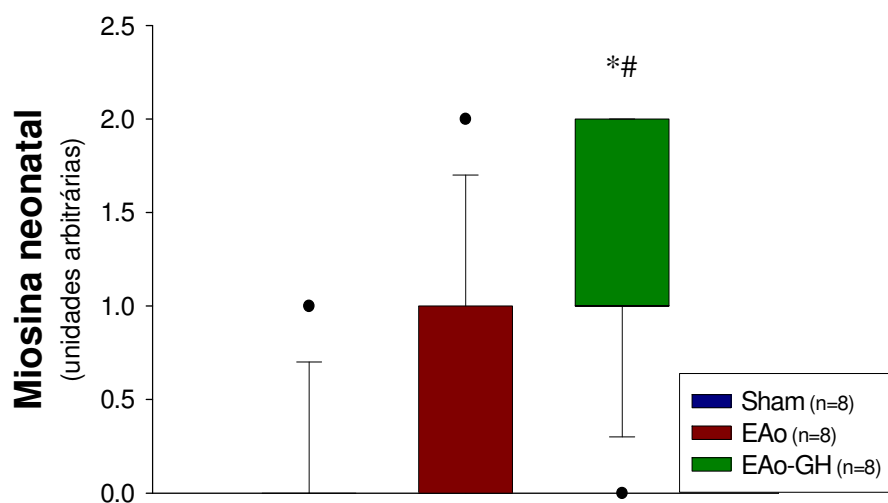


Figura 8. Análise de imunofluorescência para a isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs EAo. Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

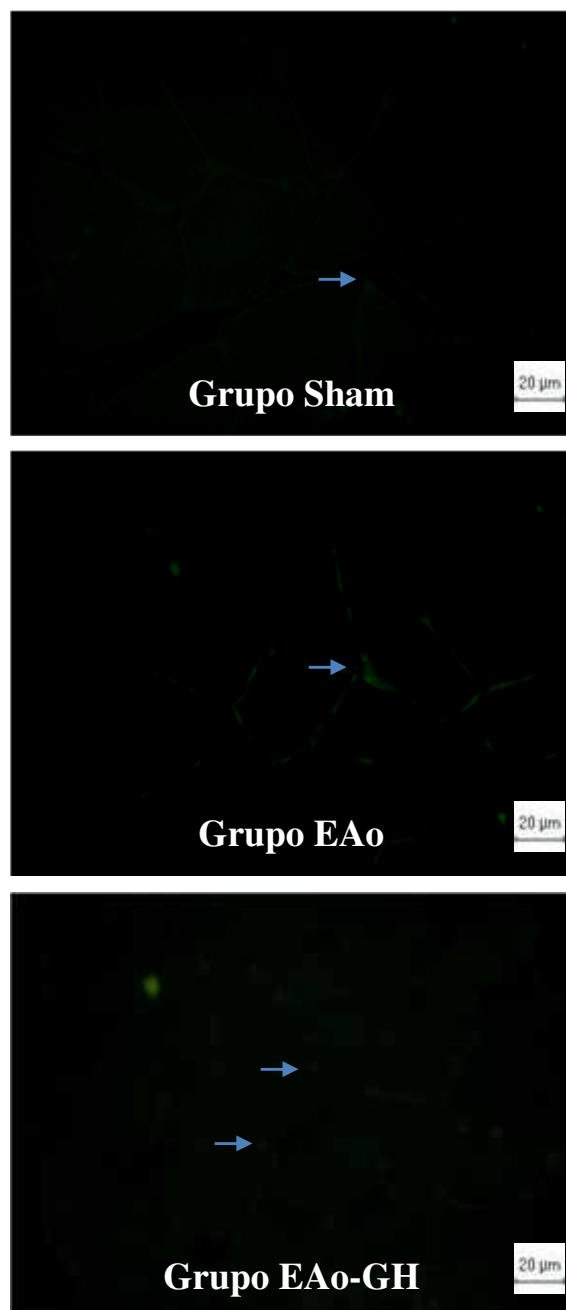


Figura 9. Fotomicrografia de fluorescência para a proteína NCAM no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento.

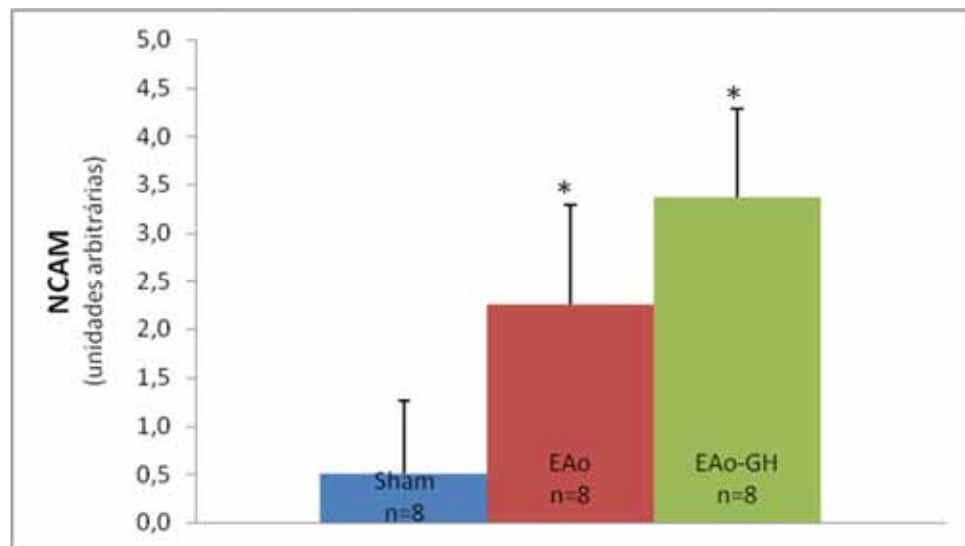


Figura 10. Análise de imunofluorescência para a proteína NCAM no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ vs Sham. Anova e Tukey.

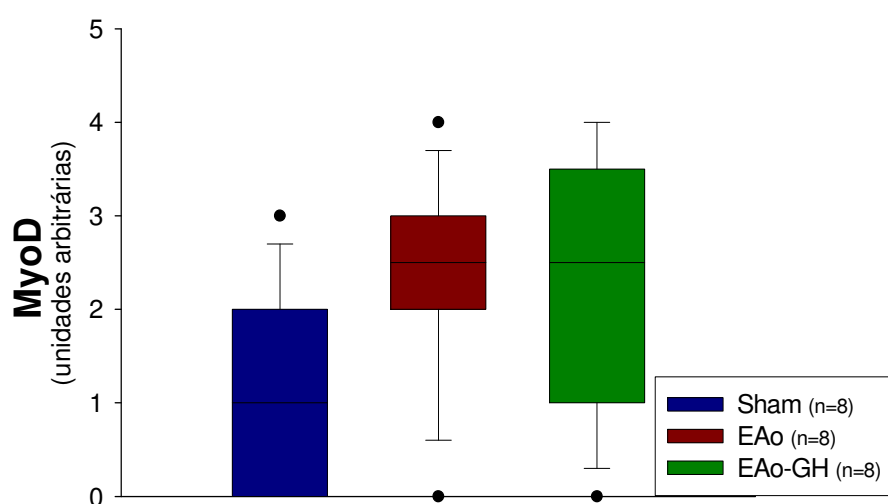


Figura 11. Análise de imunofluorescência para a proteína MyoD no músculo sóleo. EAO: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAO-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

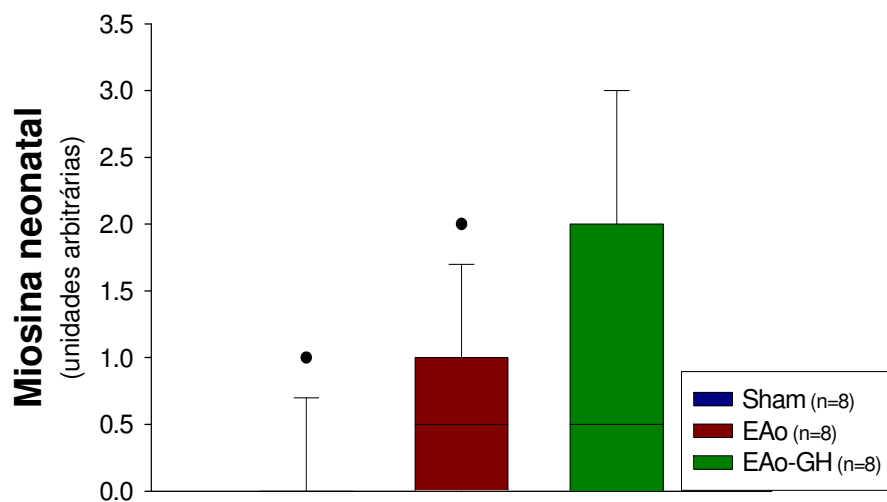


Figura 12. Análise de imunofluorescência para a isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

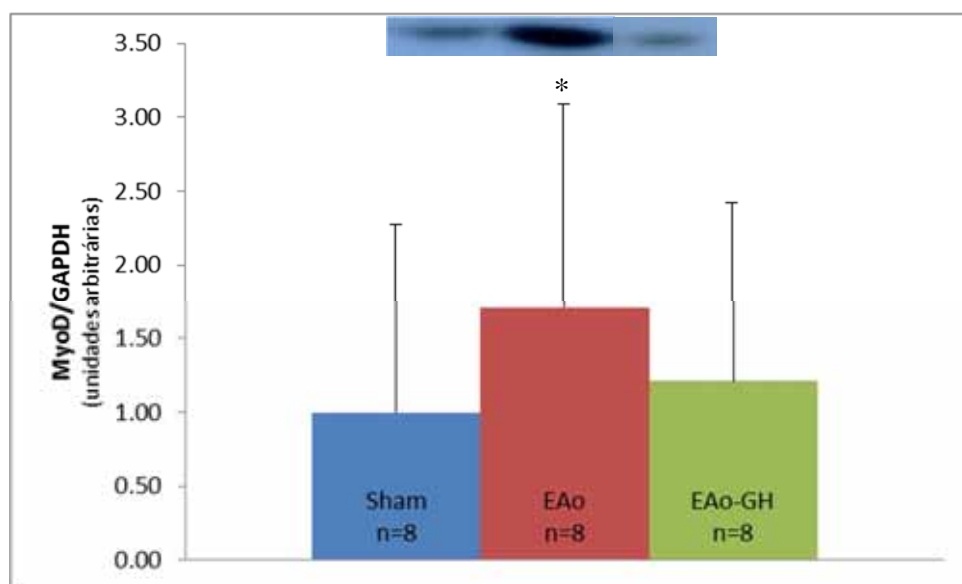


Figura 13. Expressão proteica de MyoD normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ vs Sham; ANOVA e Tukey.

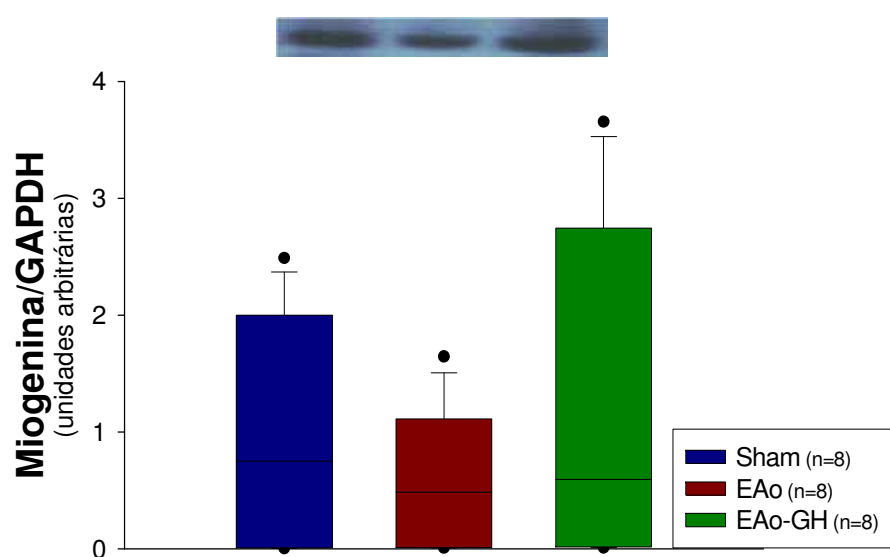


Figura 14. Expressão proteica de miogenina normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo/GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

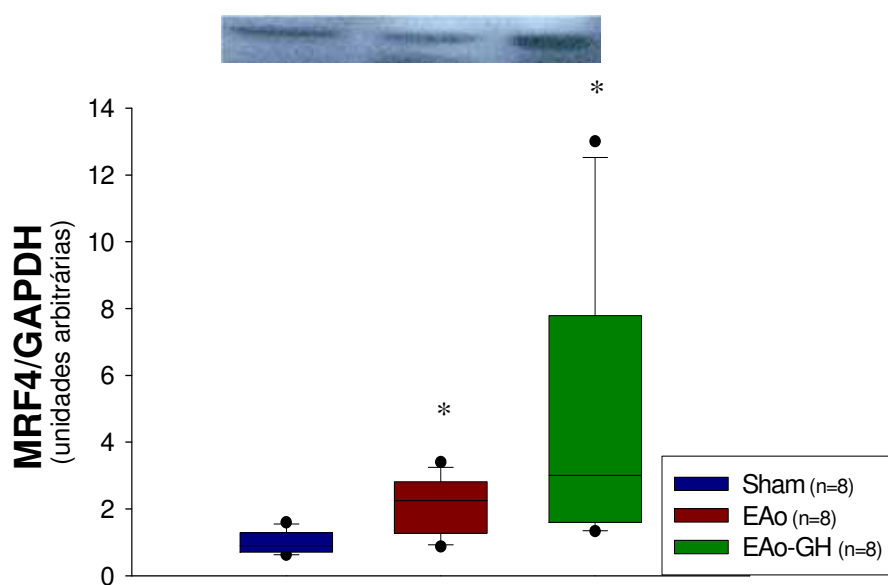


Figura 15. Expressão proteica de MRF4 normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; * $p < 0,05$ vs Sham; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

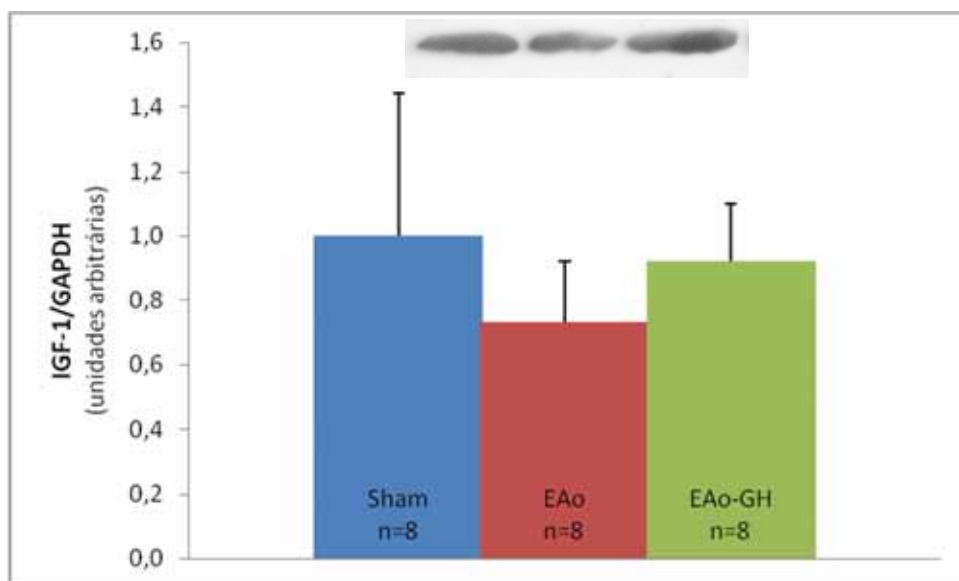


Figura 16. Expressão proteica de IGF-1 normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

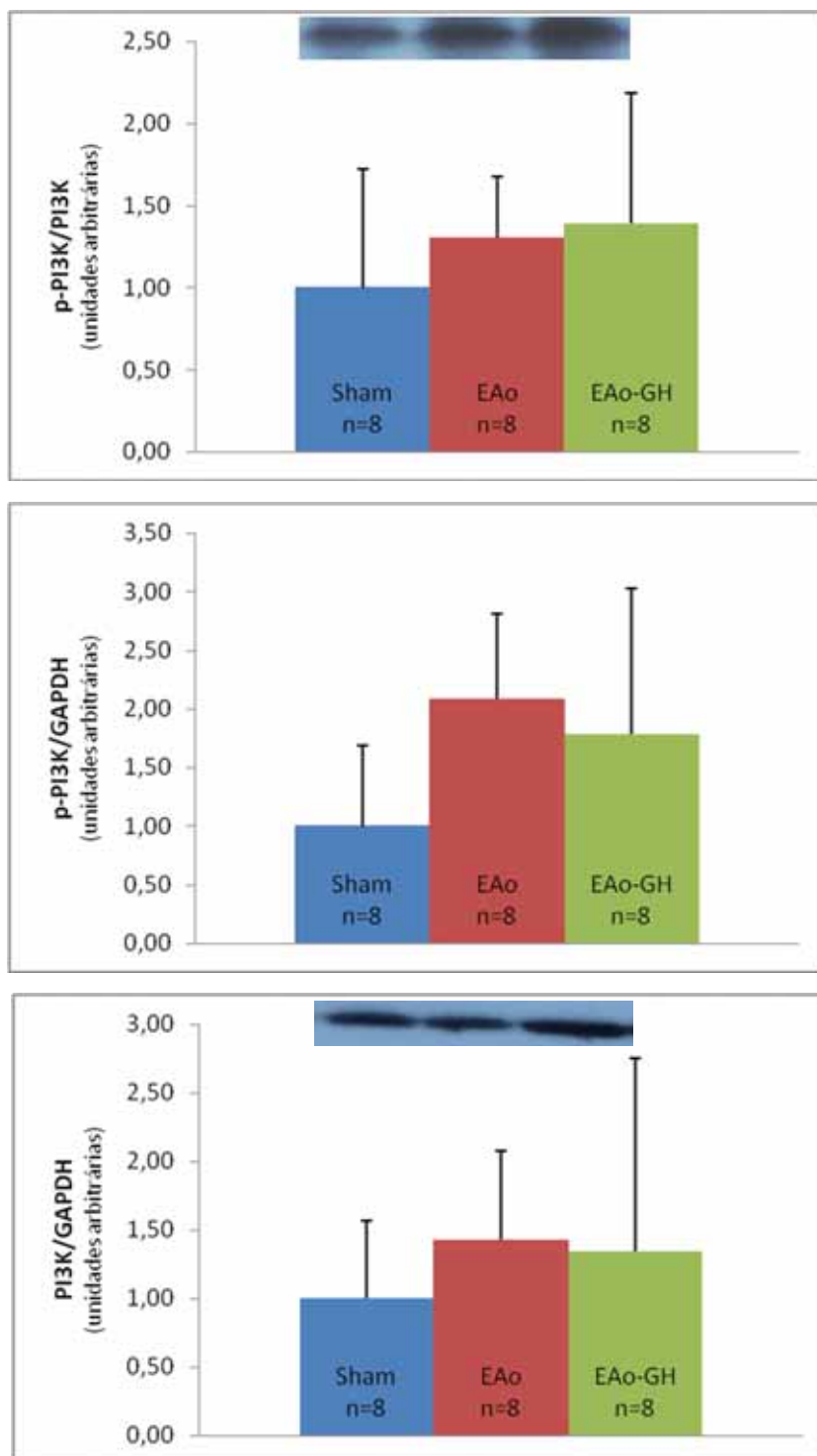


Figura 17. Expressão proteica de PI3K e p-PI3K normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. A expressão de p-PI3K foi também normalizada pelo PI3K total. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

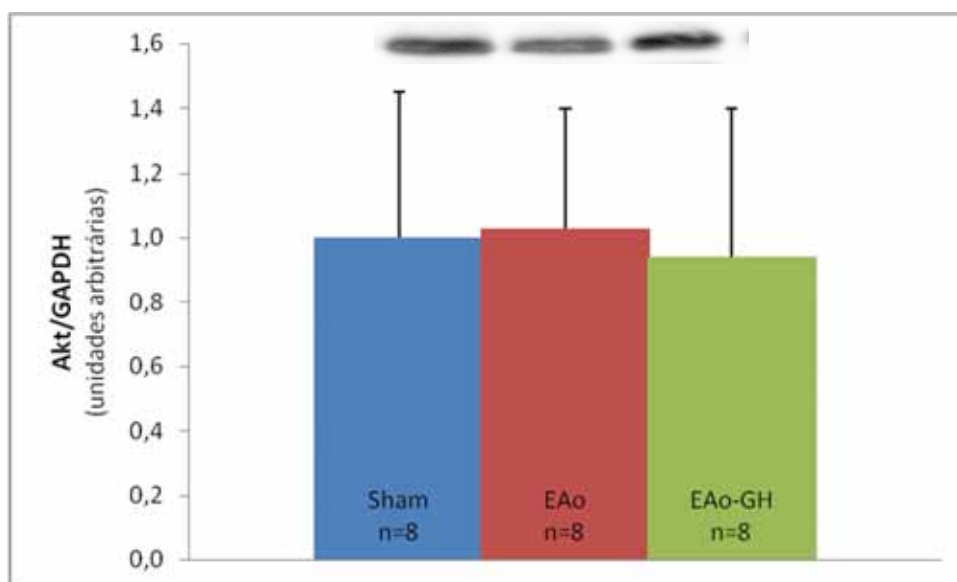


Figura 18. Expressão proteica de Akt normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

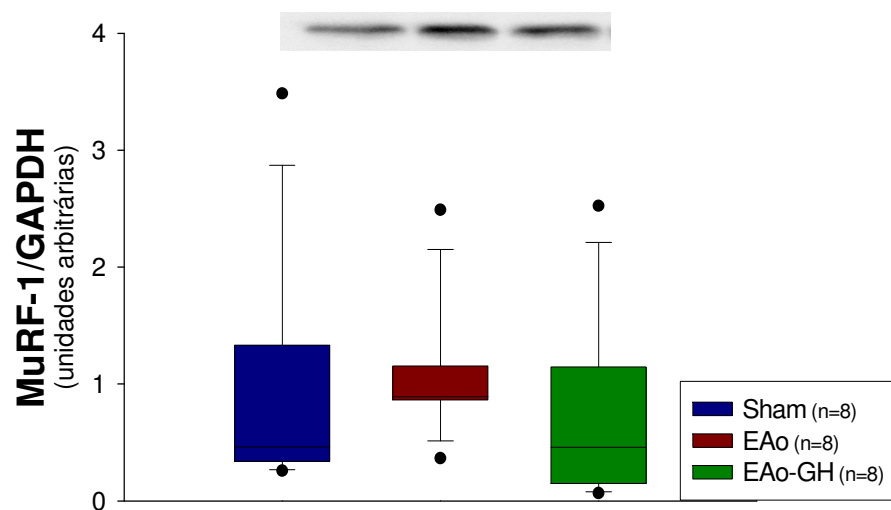


Figura 19. Expressão proteica de MuRF-1 normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

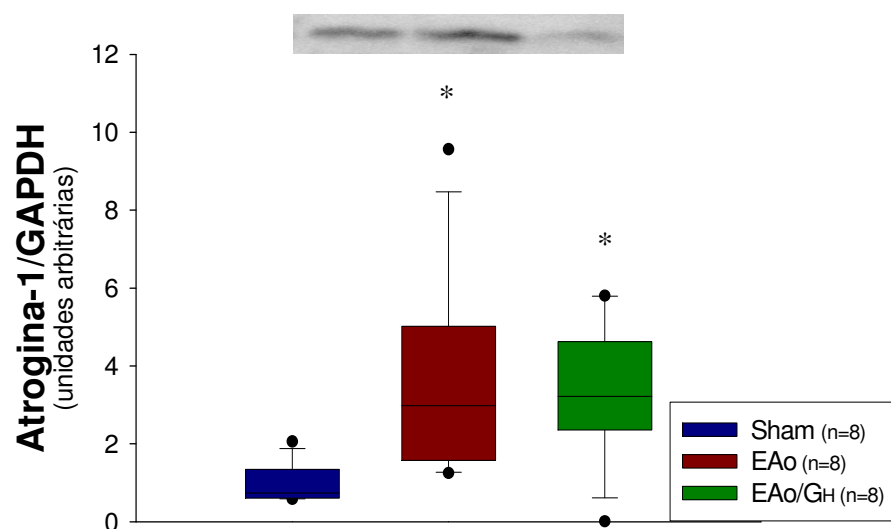


Figura 20. Expressão proteica de atrogina-1 normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; * $p < 0,05$ vs Sham; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

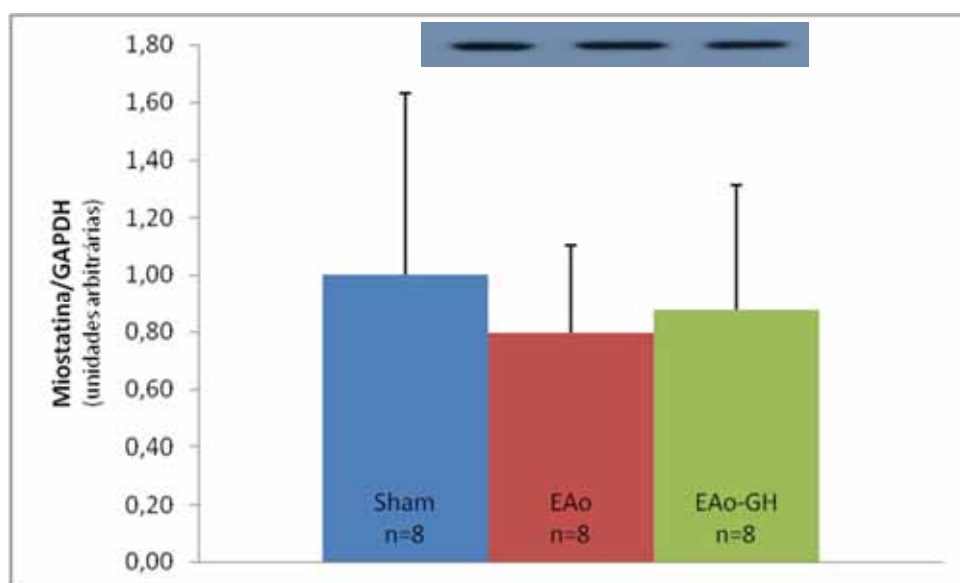


Figura 21. Expressão proteica de miostatina normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

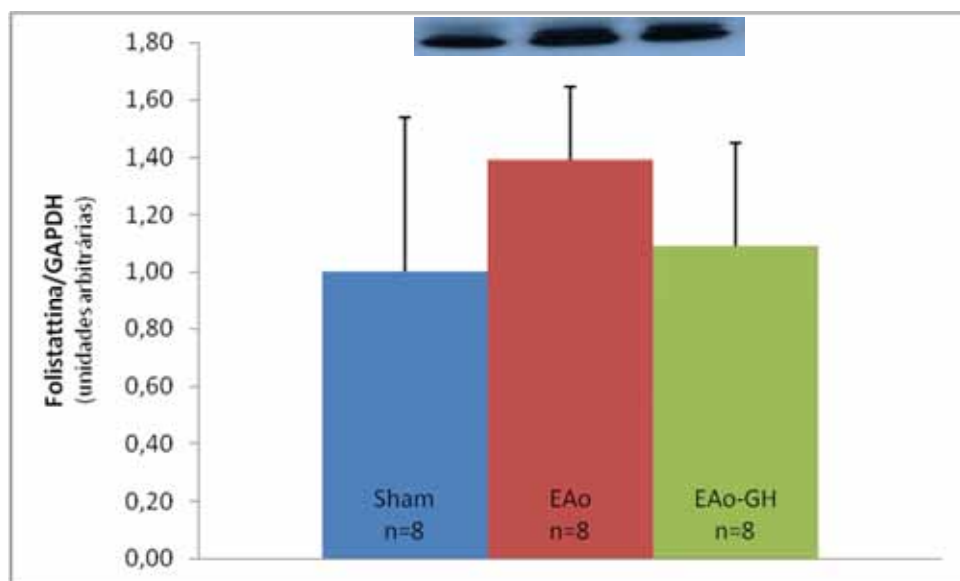


Figura 22. Expressão proteica de follistatina normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

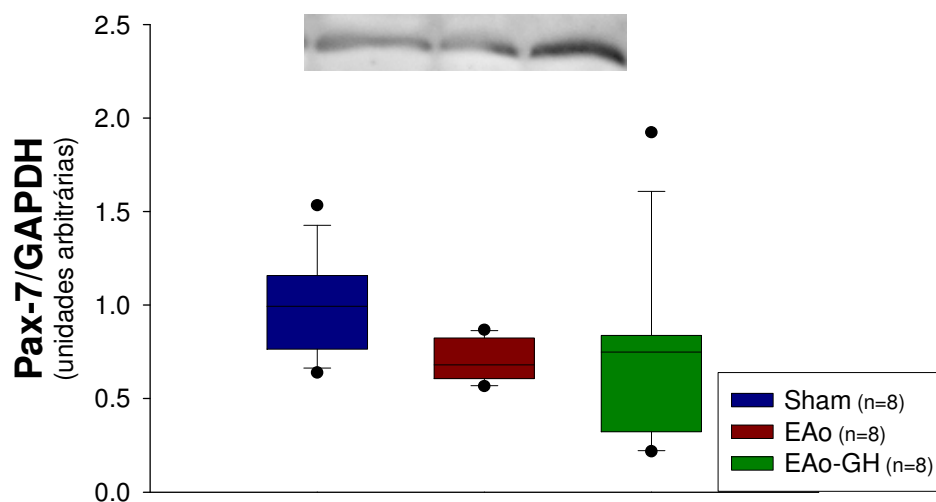


Figura 23. Expressão proteica de Pax-7 normalizada pelo GAPDH no músculo gastrocnêmio. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

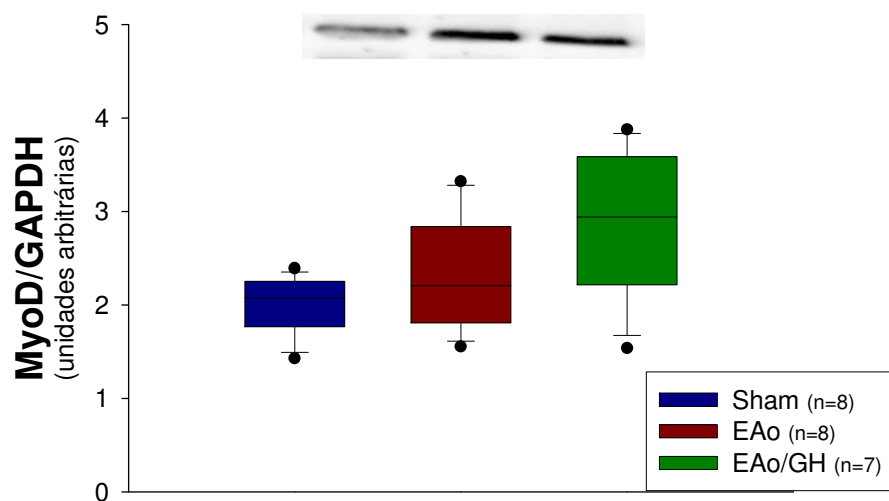


Figura 24. Expressão proteica de MyoD normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

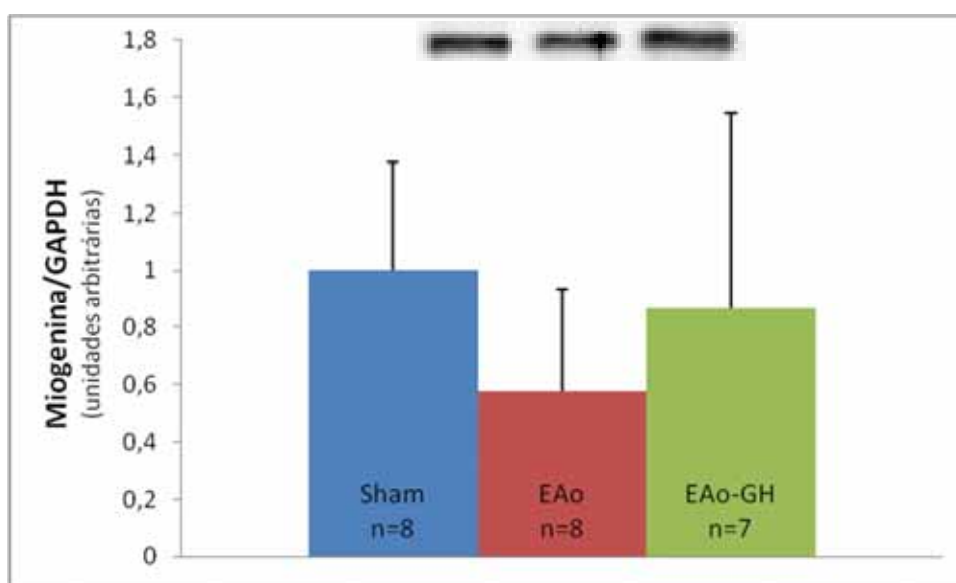


Figura 25. Expressão proteica de miogenina normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

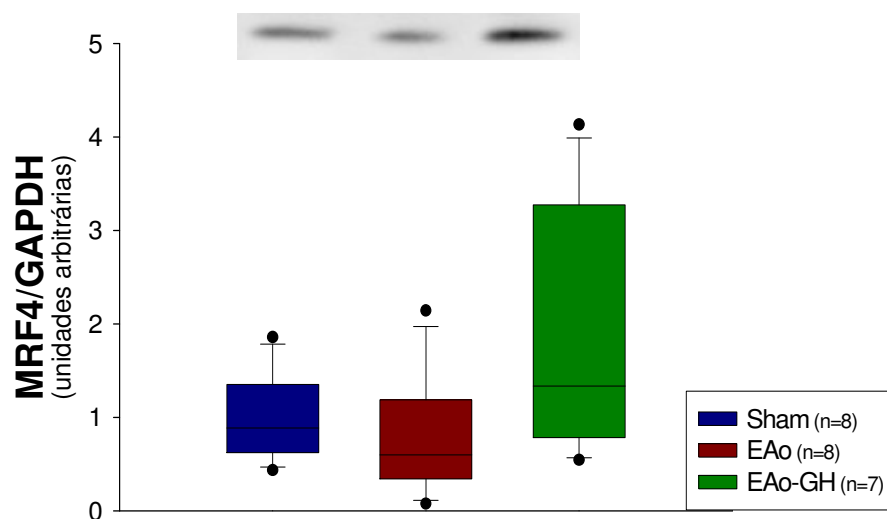


Figura 26. Expressão proteica de MRF4 normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

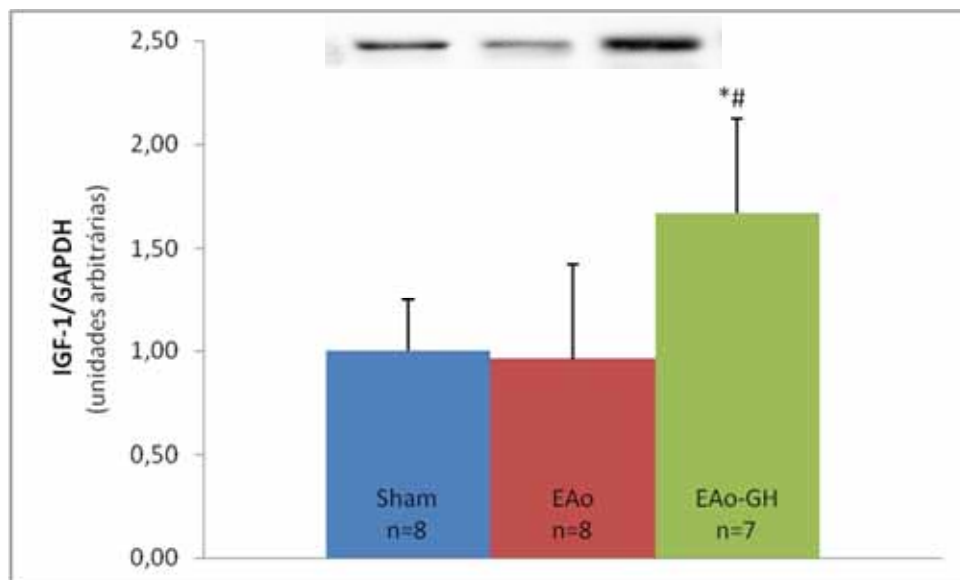


Figura 27. Expressão proteica de IGF-1 normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio de crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs EAo; ANOVA e Tukey.

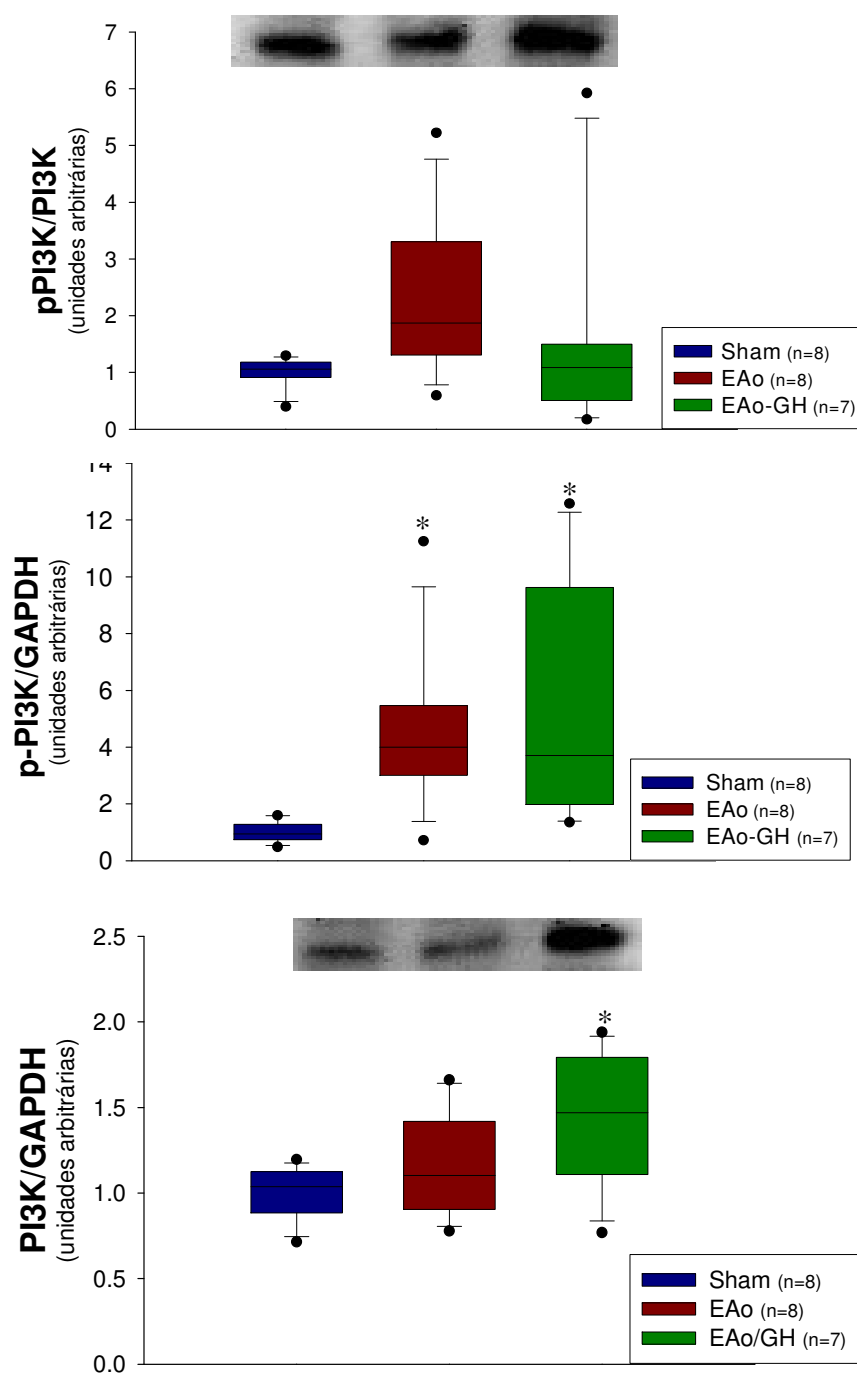


Figura 28. Expressão proteica de p-PI3K e PI3K normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. A expressão de p-PI3K foi também normalizada pela forma total de PI3K. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; * $p < 0,05$ vs Sham; Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls.

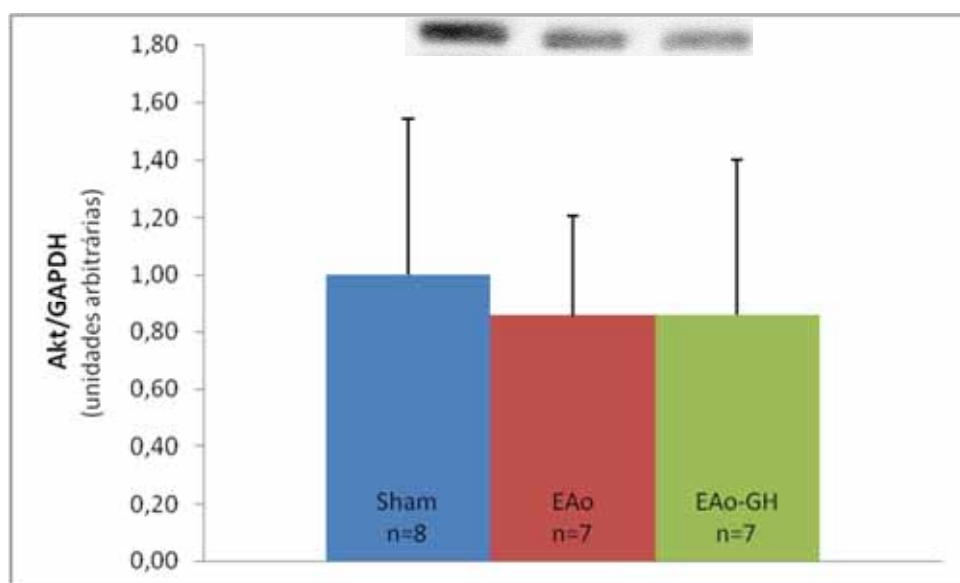


Figura 29. Expressão proteica de Akt normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

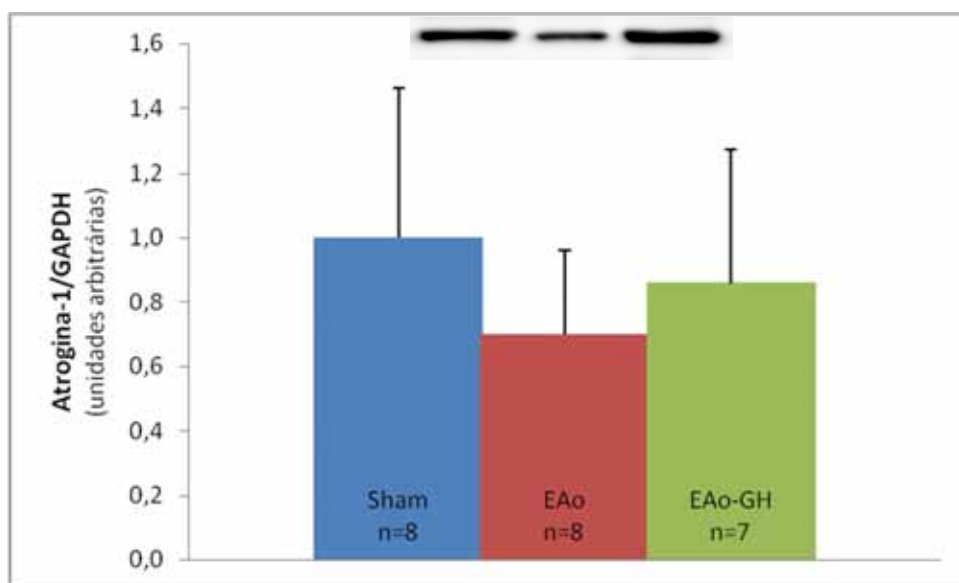


Figura 30. Expressão proteica de atrogina-1 normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

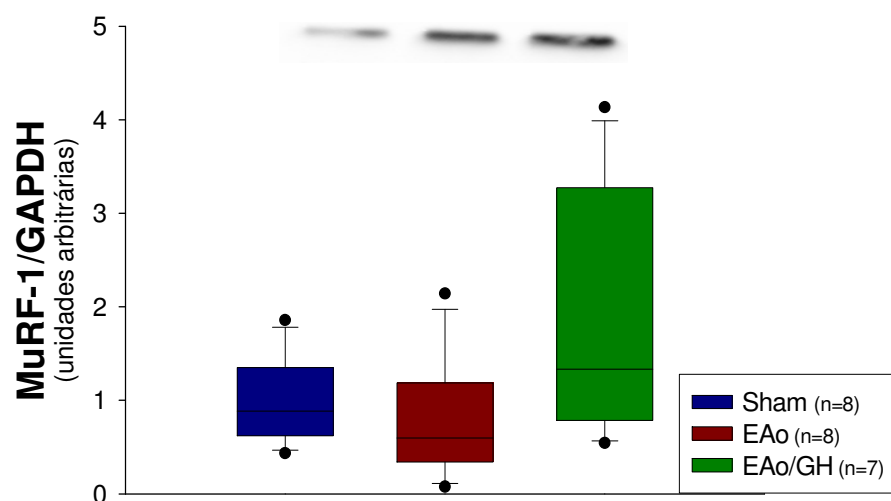


Figura 31. Expressão proteica de MuRF-1 normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em mediana e percentis; Kruskal-Wallis.

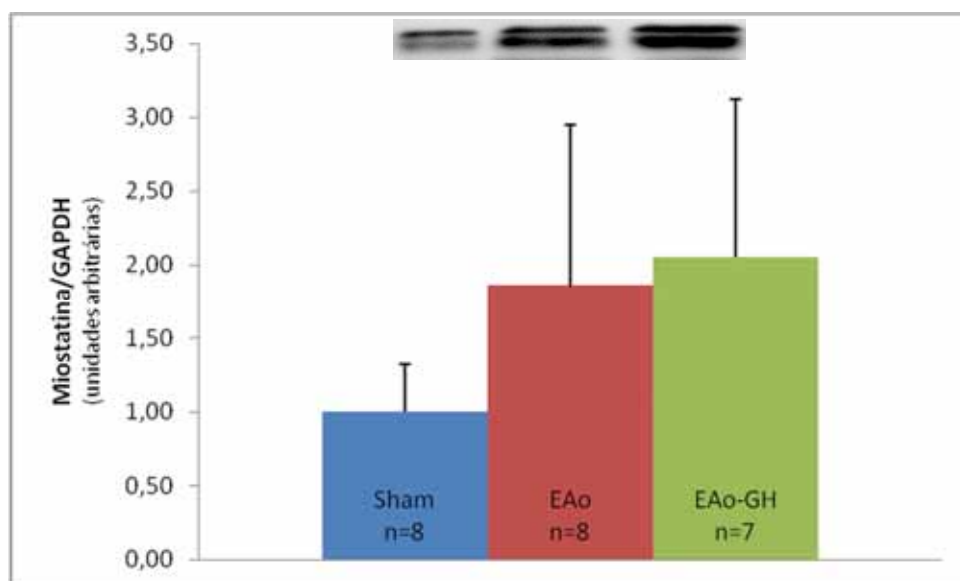


Figura 32. Expressão proteica de miostatina normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

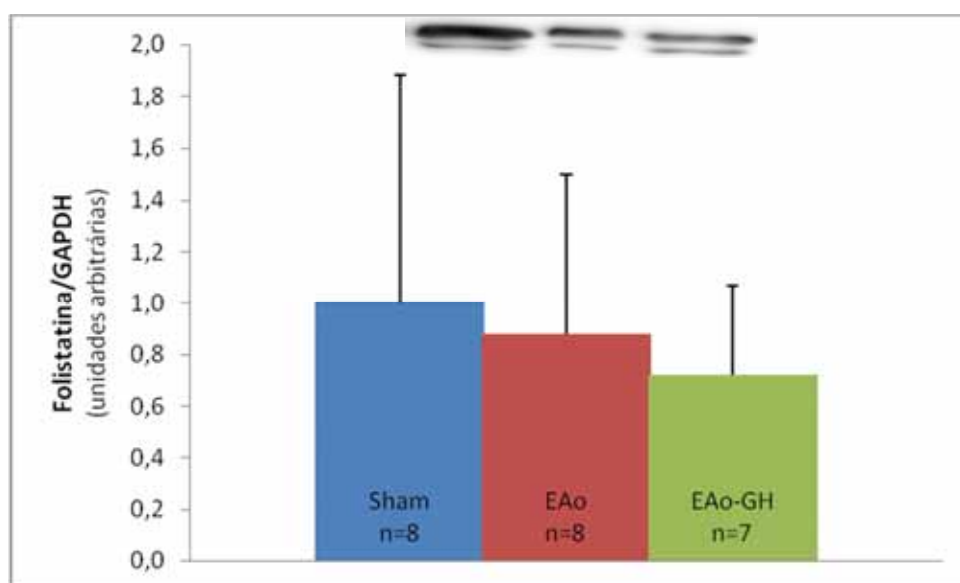


Figura 33. Expressão proteica de follistatina normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

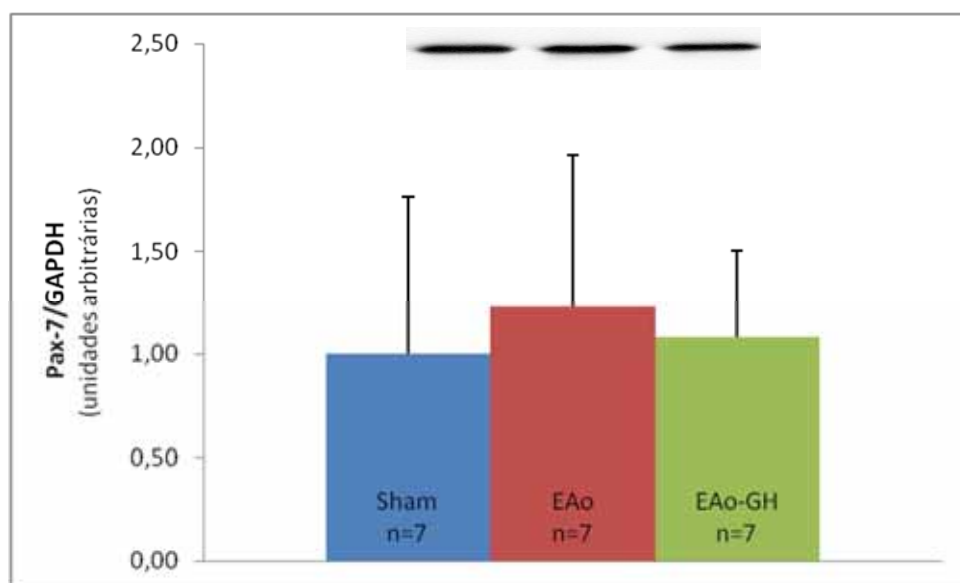


Figura 34. Expressão proteica de Pax-7 normalizada pelo GAPDH no músculo sóleo. EAo: grupo estenose aórtica sem tratamento; EAo-GH: grupo estenose aórtica tratado com hormônio do crescimento; n: número de animais. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; ANOVA.

Discussão

Neste estudo avaliamos, pela primeira vez, os efeitos da administração do hormônio de crescimento sobre vias de sinalização intracelular relacionadas ao processo de atrofia em diferentes músculos esqueléticos de ratos com insuficiência cardíaca crônica.

A insuficiência cardíaca foi induzida por estenose da aorta. Neste modelo, três a quatro semanas após o nascimento, os ratos são submetidos à cirurgia para indução da estenose da aorta ascendente. Imediatamente após a colocação de clipe ao redor da aorta, o diâmetro do vaso mantém-se preservado. Com o crescimento do animal e a manutenção do diâmetro da aorta, ocorre o aparecimento progressivo da estenose. Precocemente, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda que está associada, inicialmente, com melhora da função sistólica do coração. A seguir, começam a apresentar disfunção diastólica, seguida de piora da função sistólica, e quadro de insuficiência cardíaca congestiva, o que ocorre a partir de 18 semanas da indução da estenose ⁸¹. A vantagem do modelo é o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca, à semelhança do que se observa em humanos com sobrecarga pressórica crônica.

O diagnóstico de insuficiência cardíaca foi realizado pela observação de sinais clínicos e anátomo-patológicos avaliados *in vivo* e *post mortem* ⁹⁷⁻⁹⁹. De acordo com estudos em ratos espontaneamente hipertensos, a hipertrofia do ventrículo direito é a melhor variável para selecionar, dentre animais com sobrecarga pressórica crônica, aqueles com insuficiência cardíaca ¹⁰⁰. A hipertrofia ventricular direita é decorrente de hipertensão pulmonar resultante de aumento da pressão de enchimento do átrio esquerdo. O peso dos pulmões, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, também pode ser utilizado como índice preditor de insuficiência cardíaca em ratos ¹⁰¹. Entretanto, animais com doença avançada podem deixar de ingerir alimentos e água e apresentarem-se desidratados no momento da eutanásia, situação na qual pode não haver congestão pulmonar. Neste estudo, a frequência de sinais de insuficiência cardíaca foi elevada em ambos os grupos com estenose aórtica e não diferiu entre EAo e EAo-GH. Portanto, a administração de GH não alterou o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Antes do tratamento, os grupos com estenose caracterizaram-se por apresentar dilatação do átrio esquerdo e hipertrofia das paredes do ventrículo esquerdo com disfunção sistólica, caracterizada pela redução da velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo, e disfunção diastólica, caracterizada pelo aumento da relação E/A e redução do tempo de desaceleração da onda E e do tempo de relaxamento isovolumétrico. Os grupos com estenose aórtica apresentaram valores das estruturas cardíacas e da função do ventrículo esquerdo semelhantes entre si, exceto pela espessura sistólica do septo interventricular, que foi maior no grupo EAO-GH que no EAO.

Após tratamento, o grupo EAO apresentou redução das porcentagens de encurtamento endocárdica e mesocárdica em comparação ao Sham. O GH atenuou a disfunção sistólica, uma vez que as porcentagens de encurtamento endocárdica e mesocárdica não diferiram significativamente entre os grupos EAO-GH e Sham. A espessura relativa do ventrículo esquerdo foi maior nos grupos EAO e EAO-GH que no Sham, tanto antes como após o tratamento. O comportamento do índice mostra que ratos com estenose aórtica desenvolvem disfunção sistólica e diastólica e insuficiência cardíaca congestiva antes de apresentarem dilatação evidente do ventrículo esquerdo.

O hormônio do crescimento é um hormônio anabólico capaz de induzir hipertrofia de células musculares ⁴⁴. No coração, seus efeitos ainda não estão completamente esclarecidos. A administração crônica de GH em ratos normais induz hipertrofia miocitária com melhora da performance cardíaca e redução da concentração de tecido colágeno ^{89, 102}. Entretanto, em corações insuficientes, o papel do tratamento com ainda GH é controverso ^{75, 89, 103-105}. Em estudo prévio em ratos com estenose aórtica, observamos que a administração de GH por 14 dias atenuou o desenvolvimento de fibrose miocárdica e de disfunção sistólica ⁸⁹. Portanto, os resultados do presente estudo reforçam dados anteriores de nosso laboratório em relação à atenuação da disfunção sistólica de ratos com estenose aórtica tratados com GH.

O GH preservou o peso corporal, o que não ocorreu no grupo EAO sem tratamento. A redução do peso do corpo, denominada caquexia cardíaca, é frequentemente observada em estágios avançados da doença. Em humanos, está

associada a mau prognóstico, independentemente de variáveis importantes como idade, fração de ejeção, capacidade física ou classe funcional da insuficiência cardíaca ²³. A manutenção do peso do corpo pode indicar preservação da massa muscular total. De fato, o GH atenuou a redução do peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo. Esses foram menores no grupo EAo que no Sham; no grupo EAo-GH, os pesos dos músculos tiveram valores intermediários, não diferindo estatisticamente dos grupos EAo ou Sham.

A musculatura esquelética é formada por tecido altamente plástico, capaz de alterar suas características metabólicas, morfológicas e funcionais em situações de treinamento ou injúria ⁵⁷. A insuficiência cardíaca constitui condição clínica de agressão à musculatura esquelética, levando a adaptações da estrutura muscular ^{22, 45}. Em estudos experimentais, foi observado que os músculos esqueléticos podem ser diferentemente afetados pela insuficiência cardíaca ^{106, 107}. Portanto, selecionamos para o estudo músculos esqueléticos com diferente composição e metabolismo. A porção branca do músculo gastrocnêmio apresenta, predominantemente, fibras de contração rápida e metabolismo glicolítico. Já o sóleo, possui, preferencialmente, fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo. Além disso, esses músculos têm sido extensamente estudados em diversas condições clínicas ^{17, 18, 25, 72, 80, 108-111}.

No gastrocnêmio, embora a área seccional de suas fibras tenha sido aproximadamente 9,5% menor no grupo EAo que nos grupos Sham e EAo-GH, a diferença não alcançou significância estatística ($p=0,138$). Em estudos experimentais, o trofismo do músculo gastrocnêmio pode estar preservado ^{112, 113} ou reduzido ⁷, dependendo do modelo utilizado para indução de insuficiência cardíaca.

Apesar de não termos detectado atrofia por análise morfométrica no músculo gastrocnêmio, observamos alterações na expressão de proteínas envolvidas no processo de atrofia muscular.

Atrofia pode ser definida como a diminuição no tamanho de tecidos ou órgãos em decorrência da perda de organelas, citoplasma e proteínas ⁵⁷. Estudos em camundongos transgênicos mostraram que, no músculo esquelético, a atrofia é um processo ativo, controlado por programas de transcrição e vias específicas de

sinalização celular⁵⁷. Na atrofia, há limitação de processos anabólicos e ativação de sistemas proteolíticos intracelulares⁵⁷.

Durante indução de atrofia experimental, dois genes encontram-se fortemente expressos, o da atrogina-1 e do MuRF1^{114, 115}. A atrogina-1, via eIF3f, inibe síntese proteica e parece estimular a degradação de proteínas⁵⁷. Juntamente com o MuRF-1, atua na ubiquitinação de proteínas celulares e indução de atrofia^{28, 56}. Neste estudo, a expressão proteica de atrogina-1 foi aumentada no músculo gastrocnêmio nos grupos EAo e EAo-GH. Na insuficiência cardíaca, um dos fatores responsáveis pelo aumento da atrogina-1 é a elevação da concentração sérica do fator de necrose tumoral (TNF)- α ⁵⁷, frequentemente observada na doença avançada. É possível, portanto, que aumento da atrogina-1 preceda a redução da área seccional dos miócitos. A expressão da proteína MuRF-1 não diferiu entre os grupos.

A expressão proteica do fator de regulação miogênica MRF4 foi aumentada no gastrocnêmio do grupo EAo e não sofreu influência do tratamento com GH. O MRF4 é predominantemente expresso em fibras lentas, oxidativas, e parece desempenhar papel importante na regulação do trofismo muscular. Em estudos experimentais, a redução da expressão gênica de MRF4 foi associada à atrofia da musculatura esquelética^{15, 116}. Em nosso estudo, o aumento do MRF4 nos dois grupos com estenose aórtica pode ter sido responsável pela preservação do trofismo muscular. A expressão da miogenina não diferiu entre os grupos.

Situações em que há proliferação de células satélites são, habitualmente, caracterizadas por aumento de MyoD^{117, 118}. Em animais adultos, a ativação de células satélites geralmente está associada à ocorrência de lesão e regeneração muscular³⁹. A expressão da MyoD foi aumentada no gastrocnêmio do grupo EAo e seu aumento atenuado pelo tratamento com GH. Por outro lado, no estudo com imunofluorescência, o grupo EAo-GH apresentou visualização aumentada das proteínas NCAM e isoforma neonatal da cadeia pesada de miosina que os grupos Sham e EAo, e o grupo EAo teve expressão maior de NCAM que o Sham. Outro indicador de ativação de células satélites, o Pax-7⁶⁴ não diferiu entre os grupos. Acredita-se que a proteína seja necessária para o crescimento e reparo de fibras musculares. Embora pareça atuar como estímulo à sobrevivência celular

e proliferação de células satélites, sua expressão deve estar inibida para que ocorra o processo de diferenciação miogênica ⁶⁴. Nossos resultados sugerem, portanto, que a insuficiência cardíaca induz ativação de células satélites no gastrocnêmio, e que a administração de GH exacerba essa resposta.

Na última década, foi demonstrado o importante papel da via IGF-1/PI3K/Akt tanto na preservação da massa como no aumento da síntese proteica e desenvolvimento de hipertrofia muscular ^{55, 56}. Em cultura de células, a inibição da atividade da PI3K e da Akt leva a diminuição do tamanho celular. A ausência de estímulos pela Akt ativa proteínas da família FOXO, que se torna fortemente localizada no núcleo e promove aumento da expressão da atrogina-1 e MuRF-1 ²⁸. Neste estudo, o aumento da atrogina-1 ocorreu independentemente de alterações da via IGF-1/PI3K/Akt. O GH é potente indutor de IGF-1 ⁴⁵⁻⁴⁸. Entretanto, na insuficiência cardíaca, concentrações séricas frequentemente elevadas de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias podem causar resistência à insulina e supressão da via IGF-1/Akt ⁵⁷. Esse fato pode explicar a ausência de ativação de IGF-1/PI3K/Akt no grupo tratado com GH.

A via miostatina/folistatina tem sido considerada importante para a regulação e manutenção da massa muscular. Uma vez que a miostatina regula negativamente a massa muscular, aumento de sua expressão está associada à atrofia das fibras musculares. A folistatina age como antagonista da miostatina, ligando-se a ela e inibindo sua ação. O equilíbrio entre as duas proteínas está envolvido na manutenção do trofismo normal do músculo esquelético. Neste estudo, não observamos diferença entre os grupos na expressão das duas proteínas. Em trabalho prévio, também não detectamos alteração da miostatina ou folistatina no gastrocnêmio de ratos infartados ¹¹³.

No músculo sóleo, diferentemente do que se observou no gastrocnêmio, a área seccional dos miócitos foi reduzida no grupo EAO em comparação ao Sham, e o tratamento com GH não preveniu o processo de atrofia.

Estudos experimentais têm mostrado que o sóleo é suscetível às alterações decorrentes da insuficiência cardíaca aguda ou crônica ^{14, 15, 106}. Como já referido, o sóleo apresenta metabolismo preferencialmente oxidativo e fibras de contração lenta. Durante a insuficiência cardíaca, há desbalanço na relação entre

oferta e utilização de oxigênio, o que leva à diminuição da capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos. Redução da atividade de enzimas oxidativas com preservação da via glicolítica foi observada em pacientes com insuficiência cardíaca^{119, 120}. Assim, músculos predominantemente oxidativos são mais afetados pela miopatia associada à insuficiência cardíaca¹²¹.

Atrofia do músculo sóleo tem sido frequentemente observada em diferentes modelos experimentais de insuficiência cardíaca como infarto do miocárdio^{25, 113}, estenose aórtica^{15, 18, 122} e cardiopatia hipertensiva²⁴, e na insuficiência cardíaca direita induzida por monocrotalina¹⁴. Previamente, observamos que a atrofia do sóleo foi acompanhada por alterações na composição das cadeias pesadas de miosina^{14, 24, 25, 113}, na expressão da miostatina e folistatina²⁴, e na expressão dos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina e MRF4^{15, 16, 24, 25}.

Em ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica, observamos que a administração de GH aumentou a expressão de MyoD, preservou o trofismo muscular, e atenuou o desenvolvimento de fibrose intersticial¹⁸. No presente estudo, as proteínas IGF-1 e PI3K foram ativadas pelo GH. A expressão proteica do IGF-1 foi maior no EAo-GH que nos outros dois grupos. A ligação de IGF-1 a seu receptor ativa várias quinases intracelulares, incluindo a PI3K¹²³. A expressão da PI3K, em sua forma total, foi maior no grupo EAo-GH que no Sham e, em sua forma fosforilada, foi maior em ambos os grupos com estenose aórtica que no Sham. Como houve ativação das proteínas IGF-1 e PI3K no grupo EAo-GH, é possível que o tempo de tratamento não tenha sido suficiente para reverter o processo atrofia muscular.

À análise com imunofluorescência, os grupos EAo e EAo-GH apresentaram visualização aumentada da proteína NCAM em comparação ao Sham, o que sugere ativação de células satélites também no músculo sóleo. A expressão das demais proteínas avaliadas não diferiu entre os três grupos.

Conclusões

Em ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica, o tratamento com hormônio do crescimento atenua a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.

Em músculos esqueléticos, o tratamento com hormônio do crescimento por 14 dias não altera o trofismo muscular. Entretanto, modula diferencialmente proteínas envolvidas na ativação de células satélites e na indução de atrofia muscular. Em músculo preferencialmente glicolítico, como o gastrocnêmio, o hormônio ativa células satélites e atenua aumento na expressão de MyoD. Em músculo predominantemente oxidativo, como o sóleo, o hormônio do crescimento ativa as proteínas IGF-1 e PIK3 de sinalização intracelular.

Referências

1. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1938-1947
2. Florea VG, Mareyev VY, Achilov AA, Popovici MI, Coats AJS, Belenkov YN. Central and peripheral components of chronic heart failure: Determinants of exercise tolerance. *Int J Cardiol.* 1999;70:51-56
3. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation.* 1993;87:470-475
4. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85:1364-1373
5. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation.* 1991;84:1597-1607
6. 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
7. Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, Herijgers P, Maes K, Verbeken E, Decramer M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation.* 2005;111:996-1005
8. Georgiadou P, Adamopoulos S. Skeletal muscle abnormalities in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9:128-132
9. 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
10. 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

11. Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Yamada Y, Hanada A, Ohtsubo M, Morita N, Murakami T, Nishijima H, Kitabatake A. Comparisons of the skeletal muscle metabolic abnormalities in the arm and leg muscles of patients with chronic heart failure. *Circ J*. 2004;68:573-579
12. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999;115:836-847
13. 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
14. 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
15. 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
16. Carvalho RF, Dariolli R, L.A. JJ, 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 Path*. 2006;87:437-443
17. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path*. 2010;91:54-62
18. 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

19. Godard MP, Whitman SA, Song YH, Delafontaine P. Skeletal muscle molecular alterations precede whole-muscle dysfunction in NYHA class II heart failure patients. *Clin Interv Aging*. 2012;7:489-497
20. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure induces atrophy and myogenin downregulation in rat skeletal muscle. *Eur Heart J*. 2009;30:289-290
21. Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med*. 2001;58:742-749
22. Loncar G, Fulster S, von Haehling S, Popovic V. Metabolism and the heart: An overview of muscle, fat, and bone metabolism in heart failure. *Int J Cardiol*. 2013;162:77-85
23. Okoshi MP, Romeiro FG, Paiva SA, Okoshi K. Heart failure-induced cachexia. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100:476-482
24. 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
25. 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
26. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and cachexia: The adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3:77-94
27. Schrepper A, Schwarzer M, Schope M, Amorim PA, Doenst T. Biphasic response of skeletal muscle mitochondria to chronic cardiac pressure overload - role of respiratory chain complex activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:125-135

28. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerv.* 2006;33:155-165
29. 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
30. Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J. The role of myostatin in muscle wasting: An overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011;2:143-151
31. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:61-86
32. 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
33. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mrna expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol.* 1999;277:R601-R606
34. 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
35. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mrnas are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerv.* 2001;24:893-899
36. Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9306-9311
37. 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
38. 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
39. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-238
 40. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating myod expression. *J Biol Chem*. 2002;277:49831-49840
 41. 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
 42. 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
 43. 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
 44. Salomon F, Cuneo R, Sonksen PH. Growth hormone and protein metabolism. *Horm Res*. 1991;36:41-43
 45. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: An update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3:163-179
 46. Lewis AJ, Wester TJ, Burrin DG, Dauncey MJ. Exogenous growth hormone induces somatotrophic gene expression in neonatal liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278:R838-R844

47. Bichell BA, Kikuchi K, Rotwein P. Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor i gene transcription in vivo. *Mol Endocrinol*. 1992;6:1899-1908
48. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. Igf-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with gata-2 and nf-atc1. *Nature*. 1999;400:581-585
49. Carmeli e, Hochberg Z, Livne E, Lichtenstein I, Kestelboim C, Silbermann M, Reznick AZ. Effect of growth hormone on gastrocnemius muscle of aged rats after immobilization: Biochemistry and morphology. *J Appl Physiol*. 1993;75:1529-1535
50. Linderman JK, Gosselink KL, Booth FW, Mukku VR, Grindeland RE. Resistance exercise and growth hormone as countermeasures for skeletal muscle atrophy in hindlimb-suspended rats. *Am J Physiol*. 1994;267:R365-R371
51. Everitt AV, Terry V, Phillips MJ, Kerry HM, Shorey CD. Morphometric analysis of gastrocnemius muscle fiber size and fiber proportions in the hypophysectomized rat after prolonged administration of growth hormone or thyroxine. *Growth Dev Aging*. 1996;60:85-93
52. Roy RR, Tri C, Grossman EJ, Talmadge RJ, Grindeland RE, Mukku VR, Edgerton VR. Igf-i, growth hormone, and/or exercise effects on non-weight-bearing soleus of hypophysectomized rats. *J Appl Physiol*. 1996;81:302-311
53. Toth MJ, Ward K, van der Velden J, Miller MS, Vanburen P, Lewinter MM, Ades PA. Chronic heart failure reduces akt phosphorylation in human skeletal muscle: Relationship to muscle size and function. *J Appl Physiol*. 2011;110:892-900
54. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013;280:4294-4314
55. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003;9:344-350

56. Edstrom E, Altun M, Hagglund M, Ulfhake B. Atrogin-1/mafbx and murf1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol.* 2006;61A:663-674
57. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013;6:25-39
58. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of mafb/atrogin-1 and murf1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Archiv : Eur J Physiol.* 2011;461:325-335
59. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965;99:435-444
60. Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1993;3:210-256
61. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;123:213-257
62. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001;91:534-551
63. Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, Anderson JE. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: Markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerv.* 2005;31:283-300
64. Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat.* 2009;215:477-497
65. Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P. Pax: A murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics.* 1991;11:424-434
66. Conboy IM, Rando TA. The regulation of notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 2002;3:397-409

67. Covault J, Sanes JR. Distribution of n-cam in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986;102:716-730
68. Cornelison DD, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997;191:270-283
69. Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C174-181
70. Mitchell PO, Pavlath GK. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C1753-1762.
71. Chen C, Xu Y, Song Y. Igf-1 gene-modified muscle-derived stem cells are resistant to oxidative stress via enhanced activation of igf-1r/pi3k/akt signaling and secretion of vegf. *Mol Cell Biochem.* 2014;386:167-175
72. 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
73. Nielsen RH, Clausen NM, Schjerling P, Larsen JO, Martinussen T, List EO, Kopchick JJ, Kjaer M, Heinemeier KM. Chronic alterations in growth hormone/insulin-like growth factor-i signaling lead to changes in mouse tendon structure. *Matrix Biol.* 2013
74. Yamaguchi A, Fujikawa T, Shimada S, Kanbayashi I, Tateoka M, Soya H, Takeda H, Morita I, Matsubara K, Hirai T. Muscle igf-i ea, mgf, and myostatin mrna expressions after compensatory overload in hypophysectomized rats. *Pflugers Archiv : Eur J Physiol.* 2006;453:203-210
75. Imanishi R, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Akiyama-Uchida Y, Kawano H, Kuroda H, Nakashima M, Saenko VA, Yamashita S, Yano K. Gh supresses tgf-

beta-mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function. *Mol Cel Endocrinol*. 2004;218:137-146

76. Fazio S, Sabatini D, Capalbo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B, Sacca L. A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1996;334:809-814
77. Osterziel KJ, Strohm O, Schuler J, Friedrich M, Hanlein D, Willenbrock R, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ranke MB, Dietz R. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1998;351:1233-1237
78. Isgaard J, Bergh CH, Caidahl K, Lomsky M, Hjalmarson A, Bengtsson BA. A placebo-controlled study of growth hormone in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J*. 1998;19:1704-1711
79. Bocchi E, Moura L, Guimarães G, Souza GEC, Ramires JAF. Beneficial effects of high doses of growth hormone in the introduction and optimization of medical treatment in decompensated congestive heart failure. *Int J Cardiol*. 2006;110:313-317
80. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Angelini A, Dalla Libera L. Skeletal muscle fibres synthesis in heart failure: Role of pgc-1alpha, calcineurin and gh. *Int J Cardiol*. 2005;104:298-306
81. 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
82. Moreira VO, Castro, A.V.B, Yaegaschi, M.Y, Cicogna, A.C, Okoshi, M.P, Pereira, C.A, Aragon, F.F, Bruno, M.B, Padovani, C.R, Okoshi, K. Echocardiographic criteria for definiton of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:432-438

83. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *Eur Heart J*. 2009;30:291
84. 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
85. Rosa CM, Xavier NP, Henrique Campos D, 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
86. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff L.A.M, Oliveira Jr, S.A, Campos, D.H.S, Lima, A.R.R, Damatto, R.L, Cezar, M.D.M, Bonomo, C, Guizoni, D.M, Padovani, C.R, Cicogna, A.C, Okoshi, M.P. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol*. 2011;111:543-551
87. Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res*. 2002;22:1353-1364
88. Fioretto JR, Queiroz SS, Padovani CR, Matsubara LS, Okoshi K, Matsubara BB. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *Am J Physiol*. 2002;282:H1327-H1333
89. 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
90. Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*. 2003;242:135-144
91. Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJT, Marchionni MA, Lorell BH. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity. Muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation*. 2004;110:713-717
92. Urso ML, Chen YW, Scrimgeour AG, Lee PC, Lee KF, Clarkson PM. Alterations in mrna expression and protein products following spinal cord injury in humans. *J Physiol*. 2007;579:877-892
93. Sanoudou D, Corbett MA, Han M, Ghoddusi M, Nguyen MAT, Vlahovich N, Hardeman EC, Beggs AH. Skeletal muscle repair in a mouse model of nemaline myopathy. *Human Mol Gen*. 2006;15:2603-2612
94. Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA, Rosenzweig A. Myostatin inhibits igf-1-induced myotube hypertrophy through akt. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297:1123-1132
95. Drummond MJ, Glynn EL, Lujan HL, Dicarlo SE, Rasmussen BB. Gene and protein expression associated with protein synthesis and breakdown in paraplegic skeletal muscle. *Muscle Nerv*. 2008;37:505-513
96. 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
97. Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Physiol*. 1991;260:H136-H145

98. 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
99. Cicogna AC, Robinson, K.G, Conrad, C.H, Singh, K, Squire, R, Okoshi, M.P, Bing, O.H.L. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33:60-65
100. Bing OHL, Brooks, W.W, Robinson, K.G, Slawsky, M.T, Hayes, J.A, Litwin, S.E, Sen, S, Conrad, C.H. 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
101. Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensated heart failure. *J Hypertens*. 1999;17
102. Tanaka N, Ryoke T, Hongo M, Mao L, Rockman HA, Clark RG, Ross J, Jr. Effects of growth hormone and igf-i on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *Am J Physiol*. 1998;275:H393-399
103. Hongo M, Ryoke T, Schoenfeld J, Hunter J, Dalton N, Clark R, Lowe D, Chien K, Ross J, Jr. Effects of growth hormone on cardiac dysfunction and gene expression in genetic murine dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:431-441
104. Ross J, Jr., Ryoke T. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor i in Rexperimental heart failure. *Growth Horm IGF Res*. 1998;8 Suppl B:159-161
105. Ryoke T, Gu Y, Mao L, Hongo M, Clark RG, Peterson KL, Ross J, Jr. Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of growth hormone and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999;100:1734-1743

106. 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
107. Spangenburg EE, Talmadge RJ, Musch TI, Pfeifer PC, McAllister RM, Williams JH. Changes in skeletal muscle myosin heavy chain isoform content during congestive heart failure. *Eur J Appl Physiol*. 2002;87:182-186
108. White JP, Puppa MJ, Narsale A, Carson JA. Characterization of the male *apcmin/+* mouse as a hypogonadism model related to cancer cachexia. *Biol Open*. 2013;2:1346-1353
109. Huang J, Wang J, Gu L, Bao J, Yin J, Tang Z, Wang L, Yuan W. Effect of a low-protein diet supplemented with ketoacids on skeletal muscle atrophy and autophagy in rats with type 2 diabetic nephropathy. *PLOS One*. 2013;8:e81464
110. Tsai SW, Chen HL, Chang YC, Chen CM. Molecular mechanisms of treadmill therapy on neuromuscular atrophy induced via botulinum toxina. *Neural Plast*. 2013;2013:593271
111. Lucas JA, Zhang Y, Li P, Gong K, Miller AP, Hassan E, Hage F, Xing D, Wells B, Oparil S, Chen YF. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling induces left ventricular dilation and dysfunction in the pressure-overloaded heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H424-H432
112. Persinger R, Janssen-Heininger Y, Wing SS, Matthews DE, LeWinter MM, Toth MJ. Effect of heart failure on the regulation of skeletal muscle protein synthesis, breakdown, and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E1001-E1008
113. Lima AR, 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 Path*. 2010;91:54-62

114. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mtor pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1014-1019
115. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific f-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:14440-14445
116. Spangenburg EE, Lees SJ, Otis JS, Musch TI, Talmadge RJ, Williams JH. Effects of moderate heart failure and functional overload on rat plantaris muscle. *J Appl Physiol.* 2002;92:18-24
117. Smith CK, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol.* 1994;159:379-385
118. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the myod family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:723-732
119. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation.* 1990;81:518-527
120. 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
121. Bernocchi P, Ceconi C, Pedersini P, Pasini E, Curello S, Ferrari R. Skeletal muscle metabolism in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:2263-2273
122. Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol.* 2003;551:491-501

123. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The igf-1/pi3k/akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting foxo transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14:395-403