

Daniele Mendes Guizoni

Influência do Exercício Físico na Expressão da Miostatina e Folistatina no Músculo Sóleo de Ratos com Insuficiência Cardíaca Crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Adj. Marina Politi Okoshi

Botucatu – São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Guizoni, Daniele Mendes.

Influência do exercício físico na expressão da miostatina e folistatina no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica / Daniele Mendes Guizoni. - Botucatu, 2012

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

Orientador: Marina Politi Okoshi

Capes: 40101100

1. Insuficiência cardíaca. 2. Exercícios físicos. 3. Coração – Doenças – Pacientes – Reabilitação.

Palavras-chave: Exercício físico; Insuficiência cardíaca; Infarto do miocárdio; Miostatina; Músculo esquelético.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Anderson e MIRIAN, aos meus irmãos, JUNIOR e RODRIGO, ao meu namorado GUILHERME e a TODA MINHA FAMÍLIA, por sempre me apoiarem em todas as conquistas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, ANDERSON e MIRIAN, por serem inspiração na minha vida, por sempre me apoiarem em todas as decisões, mesmo que elas pudessem nos distanciar, por aguentarem a saudade de tantos anos longe e por sempre me darem força em todos os momentos. Pai e mãe, muito obrigada pela educação, carinho, paciência, amor, ensinamentos e dedicação em toda minha trajetória.

Aos meus irmãos, JUNIOR e RODRIGO, por serem acima de tudo amigos, conselheiros e exemplos na minha vida.

A todos os meus familiares, em especial meus avós, ÂNGELA e JOSÉ (in memoriam), PAULINA e ANTÔNIO, por todo o carinho, afeto e cuidados.

Ao meu namorado GUILHERME, por servir como alicerce na minha vida, sempre me dando apoio, proteção e segurança em todo meu caminho. Muito obrigada por todo amor, carinho e conselhos!

Aos meus futuros sogros, ISABEL e SÉRGIO, por todos os conselhos e ensinamentos, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas e por fazerem parte da minha vida.

Aos grandes amigos de Botucatu, em especial ANIELI, BÁRBARA, DANI, FELIPE e RAÍSA, por compartilharmos nossas dificuldades, alegrias e tristezas, e por todos os momentos felizes que me propiciaram nesta cidade.

À XLII TURMA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, por ser fundamental em mais uma conquista da minha vida.

Aos amigos PAULA e SÍLVIO, pela amizade, pelos ensinamentos e conselhos, pela paciência, dedicação e carinho que sempre tiveram por mim. Obrigada por toda ajuda e pelo apoio nas minhas decisões!

Aos grandes amigos ALINE, CAMILA BONOMO, MARCELO, RICARDO, PRISCILA e LUANA, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda em toda minha trajetória no laboratório, pelas risadas, pelo

companheirismo, pelo carinho, pelos cuidados e por fazerem dos meus dias em Botucatu, dias mais felizes. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos amigos Pós-graduandos e alunos de iniciação científica, em especial CAMILINHA, CAMILA G, GABRIEL, NATASHA e RODRIGO, pela amizade e colaboração neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, em especial, DIJON, MIRIANE, MARIA TERESA, REGIANE, SANDRO, RENATA, ANDRÉ N, LORETA, DANI, ADRIANA, CARLOS, PAULINHA, ANDRÉA, BRUNA, VINÍCIUS, DIEGO e DAMIANA, pela ajuda e por todos os bons momentos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, em especial ANA MENGUE, ALEXANDRE, BRUNO, ELISÂNGELA, LAURA, MÁRIO e RENATO, por toda ajuda e gentileza.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO, por toda ajuda e auxílio.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, em especial JOSÉ CARLOS, MÁRIO e VITOR, pela boa convivência e por estarem sempre prontos a me ajudar.

À Prof^a. Dra. MAELI DAL PAI-SILVA e ao Prof. Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI por aceitarem prontamente a participar da minha banca de qualificação, por todas as considerações e colaborações neste trabalho.

Ao Prof. KATASHI OKOSHI, pela realização do ecocardiograma e colaboração neste trabalho, por toda paciência, ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. LEONARDO ZORNOFF, pela realização da cirurgia de infarto, por estar sempre pronto a me ajudar e pelas colaborações neste trabalho.

Aos professores: Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, Dr. SERGIO PAIVA e Dr. ROBSON CARVALHO pela pronta colaboração neste trabalho.

À FAPESP (processo nº 2010/02077-2).

A TODOS que fizeram e fazem parte da minha vida, muito obrigada!

Agradecimento especial

Agradeço à Prof^a. Adj. MARINA POLITI OKOSHI, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos, paciência e dedicação como orientadora. Obrigada por participar de mais uma etapa na minha formação e por ter sido fundamental para a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Material e Métodos	12
Resultados	21
Discussão	37
Referências Bibliográficas	45
Atividades Desenvolvidas na Pós-Graduação.....	57

RESUMO

A insuficiência cardíaca (IC) caracteriza-se por redução da tolerância aos exercícios físicos devida à ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatogenia ainda não está completamente compreendida. Há evidências que anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética possam contribuir para a diminuição da capacidade física. A miostatina, membro da família TGF- β (fator transformador do crescimento), regula o crescimento de músculos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta. Mais recentemente, foi observado que a miostatina tem importante papel na manutenção do fenótipo muscular. A atividade da miostatina pode ser antagonizada por várias proteínas, entre as quais se destaca a folistatina. Essa proteína tem a propriedade de unir-se à miostatina e inibir sua habilidade de ligação com receptores celulares. O exercício físico tem papel importante no tratamento de doentes com IC. Entretanto, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos pelos quais o exercício resulta em melhora da capacidade física na IC. Estudo com ratos infartados mostrou que o exercício físico aeróbio, iniciado precocemente, previne aumento da expressão proteica de miostatina em músculo esquelético. Não identificamos trabalhos avaliando a influência do exercício físico, iniciado mais tardiamente, na modulação da via miostatina/folistatina na IC. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico aeróbio, iniciado tardiamente, na expressão da miostatina e folistatina no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica causada por infarto do miocárdio (IM). Três meses após cirurgia para indução do IM, os animais foram randomizados em quatro grupos: Sham sedentário (Sh-Sed, n = 12), Sham exercitado (Sh-Ex, n = 12); IM sedentário (IM-Sed, n = 11) e IM exercitado (IM-Ex, n = 10). A atividade física foi realizada em esteira com ciclos de 40 min/dia, 5 dias/semana e 16 m/min, durante 12 semanas. As estruturas cardíacas e a função do ventrículo esquerdo foram avaliadas por ecocardiograma antes e após o período de treinamento físico. O tamanho do infarto foi analisado em lâminas histológicas do ventrículo esquerdo coradas por picro-sirius red. A expressão proteica da miostatina e folistatina foi analisada por Western blot e a expressão gênica por RT-PCR em tempo real no músculo sóleo. O trofismo

muscular foi analisado em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. A comparação entre os quatro grupos foi realizada por ANOVA complementada pelo teste de Bonferroni e o nível de significância considerado foi de 5%. O grupo IM-Sed apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparado ao Sh-Sed. O treinamento físico induziu melhora da função sistólica, caracterizada pelo aumento da porcentagem de variação da área do ventrículo esquerdo em relação ao grupo IM-Sed (Sh-Sed $70,1 \pm 6,35$, $n = 12$; Sh-Ex $70,0 \pm 5,69$, $n = 12$; IM-Sed $22,8 \pm 7,86$, $n = 11$; IM-Ex $29,7 \pm 5,51$ %, $n = 10$; $p < 0,05$). O tamanho do infarto foi semelhante entre os grupos IM-Sed e IM-Ex. A área seccional do músculo sóleo não diferiu entre os grupos. A expressão gênica da miostatina foi semelhante entre os quatro grupos e a da folistatina foi significativamente menor no grupo IM-Sed que nos grupos Sh-Sed e IM-Ex (Sh-Sed $1,00 \pm 0,61$, $n = 6$; Sh-Ex $0,60 \pm 0,25$, $n = 6$; IM-Sed $0,40 \pm 0,18$, $n = 6$; IM-Ex $1,01 \pm 0,60$ unidades arbitrárias, $n = 6$; $p < 0,05$). A expressão proteica da miostatina foi estatisticamente menor no grupo IM-Sed que nos grupos Sh-Sed e IM-Ex (Sh-Sed $1,00 \pm 0,35$, $n = 9$; Sh-Ex $1,02 \pm 0,37$, $n = 9$; IM-Sed $0,66 \pm 0,18$, $n = 9$; IM-Ex $1,17 \pm 0,48$ unidades arbitrárias, $n = 9$; $p < 0,05$). A expressão proteica da folistatina não diferiu entre os grupos. Em conclusão, o treinamento físico tardio melhora a função sistólica do ventrículo esquerdo de ratos infartados e impede alterações na expressão das proteínas miostatina e folistatina.

ABSTRACT

Heart failure (HF) is characterized by exercise intolerance with early fatigue and dyspnea. Although mechanisms responsible for symptoms have been studied in the last decades, their pathophysiology is not completely understood. There is evidence that skeletal muscle intrinsic abnormalities can contribute to the reduced physical capacity. Myostatin, a member of transforming growth factor- β family, has been shown to modulate muscle growth and mass. Myostatin activity can be antagonized by several proteins. One of the most studied is follistatin, which has the ability to bind myostatin inhibiting its cell receptors ligation. Exercise plays an important role in the HF treatment. However, the mechanisms involved in physical capacity improvement are not clear. In infarcted rat, early aerobic exercise prevented myostatin change in skeletal muscle. We did not find studies assessing the influence of late physical exercise on the myostatin/follistatin pathway during HF. The aim of this study was to evaluate the effects of late exercise training on myostatin and follistatin expression in soleus muscle of rats with myocardial infarction (MI)-induced heart failure. Three months post-MI, rats were randomized into four groups: Sham sedentary (Sh-Sed, n = 12), Sham exercised (Sh-Ex, n = 12), MI sedentary (MI-Sed, n = 11) and MI-exercised (MI-Ex, n = 10). Exercise training was performed on a treadmill with cycles of 40 min/day, 5 days/week and 16 m/min for 12 weeks. Cardiac structures and left ventricular function were assessed by echocardiogram before and after physical training. Infarct size was measured by left ventricular histological analysis. Myostatin and follistatin gene expression of was analyzed by real-time PCR and protein levels by Western blot in the soleus muscle. Fibre trophism was evaluated by morphometric analysis. Comparisons between groups were performed by ANOVA and Bonferroni test and significance level was 5%. Left ventricular dilation and dysfunction were observed in MI-Sed group compared to Sh-Sed. Exercise training improved systolic function in the MI-Ex group, characterized by increased left ventricular fractional area change when compared to MI-Sed group (Sh-Sed 70.1 ± 6.35 , n = 12; Sh-Ex 70.0 ± 5.69 , n = 12; MI-Sed 22.8 ± 7.86 , n = 11; MI-Ex $29.7 \pm 5.51\%$, n = 10; p < 0.05). Infarct size was similar between MI-Sed and MI-Ex groups. Soleus muscle cross-sectional area did not differ between groups. Gene expression of myostatin was similar between

groups and follistatin was significantly lower in MI-Sed than in Sh-Sed and MI-Ex groups (Sh-Sed 1.00 ± 0.61 , $n = 6$; Sh-Ex 0.60 ± 0.25 , $n = 6$; MI-Sed 0.40 ± 0.18 , $n = 6$; MI-Ex 1.01 ± 0.60 arbitrary units, $n = 6$; $p < 0.05$). Myostatin protein levels was lower in MI-Sed than in Sh-Sed and MI-Ex groups (Sh-Sed 1.00 ± 0.35 , $n = 9$; Sh-Ex 1.02 ± 0.37 , $n = 9$; MI-Sed 0.66 ± 0.18 , $n = 9$; IM-Ex 1.17 ± 0.48 arbitrary units, $n = 9$; $p < 0.05$). Follistatin protein levels did not differ between groups. In conclusion, late exercise training improves left ventricular systolic function in infarcted rats and prevents changes in myostatin and follistatin expression.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca crônica constitui um problema clínico de considerável importância devido à gravidade de suas manifestações e à sua grande prevalência (Albanesi Filho 2005; Givertz *et al.* 2005; Rossi Neto 2004). No Brasil, conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a insuficiência cardíaca encontra-se entre as principais causas de internação hospitalar, considerando-se todas as internações do Sistema Único de Saúde (Albanesi Filho 2005; Rossi Neto 2004).

Importante característica da insuficiência cardíaca é a redução da tolerância aos exercícios físicos devido à ocorrência precoce de fadiga e dispnéia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatogenia ainda não é completamente compreendida (Strassburg *et al.* 2005). Inicialmente, considerava-se que a capacidade reduzida para exercícios e a ocorrência prematura de sintomas fossem causadas por diminuição da capacidade funcional do coração com conseqüente congestão pulmonar, redução da perfusão e oxigenação tecidual. Posteriormente, foi observado que há fraca associação entre variáveis hemodinâmicas e de função ventricular em repouso e tolerância ao exercício, tanto em humanos como em animais com insuficiência cardíaca (Clark *et al.* 1994; Harrington *et al.* 2001; Smith *et al.* 2005). Como não foi confirmada a suposição inicial que a capacidade para exercícios fosse diretamente relacionada ao grau de disfunção ventricular, foi levantada a hipótese que alterações primárias na musculatura esquelética periférica pudessem ter papel na tolerância reduzida aos exercícios físicos (Harrington *et al.* 1997).

A partir de 1990, diversas anormalidades passaram a ser descritas em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca como atrofia (Anker *et al.* 1999; Mancini *et al.* 1992), aumento de fibrose e redução da densidade capilar (Schieffer *et al.* 1995). Além das alterações morfológicas, também foram descritas anormalidades metabólicas, enzimáticas e bioquímicas. Alterações no padrão das fibras musculares esqueléticas, com aumento das fibras tipo II, rápidas, e redução das fibras tipo I, lentas, têm sido frequentemente encontradas na insuficiência cardíaca (Sullivan *et al.* 1991).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas alterações musculares associadas à insuficiência cardíaca ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns fatores podem estar envolvidos como redução da atividade física e neuromuscular e ativação sistêmica de neurohormônios e citocinas inflamatórias que acompanham o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Carvalho *et al.* 2003; Okoshi *et al.* 2000; Okoshi *et al.* 2001; Sullivan *et al.* 1990).

Mais recentemente, foi observado que a via miostatina/folistatina tem importante papel na manutenção do fenótipo muscular. A miostatina, previamente denominada GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8), foi descoberta em pesquisa na identificação de novos membros da super família TGF- β (fator transformador do crescimento-beta) de fatores de diferenciação e crescimento celular (Lee 2004; McPherron *et al.* 1997). A miostatina difere das outras proteínas da superfamília TGF- β por ser expressa quase que exclusivamente na musculatura esquelética. Estudos sobre seu papel fisiológico mostraram correlação negativa entre expressão gênica da miostatina e massa muscular, o que sugere seu potencial papel para induzir atrofia da musculatura esquelética (Guizoni *et al.* 2010; McPherron & Lee 1997).

Em gado, foi verificado que mutações do gene para miostatina estavam associadas a importante hipertrofia muscular (McPherron & Lee 1997). Da mesma forma, camundongos com deleção do gene para miostatina apresentaram aumento da massa muscular decorrente de hipertrofia e hiperplasia das fibras (Carlson *et al.* 1999; McPherron *et al.* 1997; Reardon *et al.* 2001; Zimmers *et al.* 2002). Reforçando esses dados, o aumento da expressão gênica da miostatina em camundongos adultos resultou em intensa perda de músculo e gordura, semelhantemente ao que ocorre nas síndromes de caquexia humana (Zimmers *et al.* 2002). Em pacientes com AIDS, há evidências de aumento da expressão e secreção intramuscular de miostatina, o que pode contribuir para a fisiopatologia multifatorial da perda acentuada de proteína muscular na doença (Gonzalez-Cadavid *et al.* 1998). Finalmente, a inibição farmacológica da miostatina por anticorpo monoclonal causou hipertrofia e aumento da força muscular em camundongos adultos ou idosos, sem levar a

alterações no tamanho ou histologia de órgãos como rins, fígado e coração (Whittemore *et al.* 2003).

A miostatina circula no sangue associada a propeptídeo, em forma de complexo latente. Após clivagens proteolíticas e dissociações, o complexo propeptídeo-miostatina libera o componente ativo, a miostatina (Hill *et al.* 2002; Hill *et al.* 2003; Lee 2004). A atividade da miostatina pode ser inibida por diferentes proteínas como a folistatina, os genes relacionados à folistatina (FLRG), os fatores de crescimento e diferenciação associados à proteína-I plasmática (GASP-I), e o próprio propeptídeo com o qual forma complexo circulante (Hill *et al.* 2002; Hill *et al.* 2003; Lee 2004). Há evidências de que a folistatina seja um dos principais antagonistas da miostatina (Lee & McPherron 2001).

A folistatina é expressa em vários tecidos e atua como antagonista de diferentes membros da família TGF- β (Amthor *et al.* 2004). Quando sua expressão encontra-se aumentada, ocorre inibição da atividade da miostatina (Nakatani *et al.* 2008). A folistatina tem a propriedade de se unir à miostatina e inibir sua habilidade para se ligar a receptores celulares. Em camundongos, o knockout do gene para a folistatina resultou em redução da massa muscular ao nascimento, enquanto o aumento de sua expressão foi associado a crescimento global da musculatura esquelética (Lee 2004; Lee & McPherron 2001).

Em situações de insuficiência cardíaca crônica, há poucos estudos sobre o comportamento da via miostatina/folistatina em músculos esqueléticos. Em ratos com infarto do miocárdio, foi observado que a expressão proteica da miostatina encontra-se aumentada em músculo esquelético (Lenk *et al.* 2009). Por outro lado, em nosso laboratório, verificamos que atrofia do músculo sóleo foi acompanhada por redução da expressão proteica da folistatina, enquanto a expressão da miostatina manteve-se inalterada em ratos com insuficiência cardíaca crônica (Lima *et al.* 2010). Estes dados sugerem que a expressão reduzida da folistatina pode ter aumentado a atividade da miostatina, resultando em redução do trofismo muscular.

Atualmente, considera-se que o exercício físico apresenta papel importante no tratamento de doentes com insuficiência cardíaca (Anker *et al.*

1999; Brum *et al.* 2011; Coats 2002; Downing & Balady 2011; Lenk *et al.* 2009; Mou *et al.* 2009; Wisloff *et al.* 2007). Entretanto, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos pelos quais o exercício resulta em melhora da capacidade física na insuficiência cardíaca. Recentemente, Lenk *et al.* (2009) mostraram que o exercício físico aeróbio, iniciado precocemente, previne aumento da expressão proteica de miostatina no músculo esquelético de ratos com infarto do miocárdio. Ainda não está definido, entretanto, se o exercício físico, iniciado mais tardiamente, resulta em modulação da via miostatina/folistatina na insuficiência cardíaca.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do exercício físico aeróbio, iniciado tardiamente, na expressão da miostatina e folistatina no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica causada por infarto do miocárdio.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo número 808.

Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal de 200 a 250 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos de luminosidade invertido de 12 h, e foram alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum*.

O infarto agudo do miocárdio foi produzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (Martinez *et al.* 2011). Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridato de cetamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mononylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com algodão 10. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto. Foram constituídos dois grupos de animais: controle (Sham) e infarto do miocárdio (IM). O período experimental foi de seis meses.

Após a indução de infarto do miocárdio, o desenvolvimento de insuficiência cardíaca ocorre, habitualmente, em ratos com infartos grandes, que acometem porcentagem equivalente ou superior a 40% da massa do ventrículo esquerdo (Martinez *et al.* 2011). Portanto, três meses após a indução do infarto, foi realizado ecocardiograma transtorácico para avaliação do tamanho do infarto. Ratos com infartos pequenos ou moderados foram descartados do presente estudo. A seguir, foram constituídos quatro grupos de animais:

- 1) grupo Sham Sedentário (Sh-Sed, n = 12);
- 2) grupo Sham Exercitado (Sh-Ex, n = 12);
- 3) grupo Infarto do Miocárdio Sedentário (IM-Sed, n = 15);
- 4) grupo Infarto do Miocárdio Exercitado (IM-Ex, n = 20).

O tamanho do infarto foi confirmado, *post-mortem*, por análise histológica do ventrículo esquerdo. Animais que apresentaram porcentagem de área infartada menor que 40% do ventrículo esquerdo foram excluídos das análises subsequentes.

A presença de insuficiência cardíaca foi avaliada durante a eutanásia pela pesquisa dos seguintes sinais clínico e/ou anátomo-patológicos: taquipnéia/respiração laboriosa, avaliada *in vivo*, e ascite, congestão hepática, derrame pleuropericárdico, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito/peso corporal maior que 0,8 mg/g) e congestão pulmonar (peso dos pulmões em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal maior que dois desvios padrão acima da média do grupo sham), avaliados *post-mortem* (Bing *et al.* 1995; Cicogna *et al.* 1999; Lima *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2003).

Treinamento físico

A atividade física foi realizada três meses após a cirurgia em esteira rolante por período de 12 semanas. Inicialmente, houve período de uma semana para adaptação, com aumento gradativo da velocidade e tempo de exercício. A seguir, o treinamento físico foi realizado com ciclos de 40 min/dia, 5 dias/semana, com velocidade de 16 m/min, de acordo com protocolo previamente descrito para ratos infartados (Mou *et al.* 2009).

Avaliação morfológica e funcional do coração pelo ecocardiograma

Três e seis meses após o procedimento cirúrgico (antes e após o período de treinamento físico), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intraperitoneal,

para o estudo ecocardiográfico. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma. Foi utilizado aparelho Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório (Fioretto *et al.* 2002; Okoshi *et al.* 2002; Okoshi *et al.* 2004). 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 (Lang *et al.* 2005) já validadas no modelo de ratos infartados (Solomon *et al.* 1999). As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a área diastólica (AD) da cavidade ventricular esquerda foram mensurados no momento do ciclo cardíaco correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico (DSVE) e a área sistólica (AS) da cavidade do ventrículo esquerdo foram obtidos no momento em que a cavidade apresentava o diâmetro mínimo. Foram mensurados também os diâmetros do átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO). A função sistólica do VE foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de encurtamento endocárdico [$\Delta D = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$], pela velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e pela porcentagem de variação de área [$\Delta \text{Área} = (AD - AS) / AD * 100$]. O fluxo diastólico transmitral foi obtido com o transdutor colocado na posição apical quatro câmaras, permitindo as medidas da onda E (E), onda A (A) e do tempo de desaceleração da onda E (TDE). O tempo entre o final da ejeção e o início do enchimento diastólico ventricular, correspondente ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), foi mensurado. A avaliação conjunta do desempenho miocárdico sistólico e diastólico foi realizada pelo índice de performance miocárdica [(tempo de contração isovolumétrica + tempo de relaxamento isovolumétrico) / tempo de ejeção] (Tei *et al.* 1997). A frequência cardíaca (FC) foi calculada pelo intervalo de tempo entre dois batimentos

consecutivos. A reprodutibilidade intra-observador foi testada em subgrupo de animais e a variabilidade não excedeu 5% (Martinez *et al.* 2011).

Coleta da musculatura esquelética e de outros tecidos para análise

Um dia após a realização do ecocardiograma, os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. O coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios foram removidos e os ventrículos direito e esquerdo pesados separadamente. A seguir, foram dissecados os músculos sóleos dos membros pélvicos direito e esquerdo. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80°C. Os pulmões foram pesados para avaliação do grau de congestão pulmonar.

Análise histológica do coração

Para caracterizar o grau de comprometimento do coração pelo infarto do miocárdio, foi realizada a mensuração da porcentagem de área infartada em relação à área total do VE. Foi realizado corte transversal do VE a 6 mm do ápice para a base; esse corte reflete a média dos resultados de cortes de todo o ventrículo (Oh *et al.* 1993). Amostras anelares do VE foram mantidas em solução de formol a 10% por 24 h. A seguir, foram lavadas em água corrente por 24 h e transferidas para solução com etanol 70%. O tecido miocárdico foi incluído em parafina, seccionado em cortes histológicos de 4 µm e corado em lâmina com solução de picro-sirius red. As medidas morfométricas foram realizadas com o auxílio de 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). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais. O valor foi expresso em porcentagem do VE (Kalkman *et al.* 1995; Minicucci *et al.* 2007).

Análise histológica da musculatura esquelética

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido muscular 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 criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente às fibras musculares. A seguir, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para análise morfológica geral. A avaliação do tamanho das fibras musculares foi realizada por sistema de análise por imagem computadorizada. Em cada lâmina, foi efetuada a mensuração das áreas das fibras musculares, segundo os critérios preconizados por Dubowitz (1985). Para cada animal, foram medidos, em média, 20 campos, totalizando 150 a 200 fibras. Nos mesmos campos, foi avaliada também a frequência de fibras em processo de segmentação, fenômeno conhecido como *splitting* celular. As fibras foram consideradas em *splitting* quando na área equivalente a uma fibra foram encontradas duas ou mais fibras (Eriksson *et al.* 2006).

Avaliação da expressão gênica da miostatina e folistatina por RT-PCR em tempo real

A análise dos mRNAs da miostatina e folistatina e dos genes constitutivos ciclofilina e GAPDH foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR). A extração de RNA total do músculo esquelético sóleo foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com o método previamente descrito (Martinez *et al.* 2010). Resumidamente, o fragmento muscular congelado foi mecanicamente homogeneizado em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, a solução foi acrescida de 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizada vigorosamente e incubada por 3 min à temperatura

ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa formada após a centrifugação foi separada, acrescida de 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubada por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4 °C. O sedimento de RNA foi submetido a secagem por 10 min à temperatura ambiente e ressuspenso em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60 °C, por 10 min. Para remover qualquer contaminação de DNA, as amostras foram incubadas com DNase I (#18068-015, Invitrogen Life Technologies). Posteriormente, foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm foi de aproximadamente 2,0.

Um micrograma de RNA foi submetido a RT utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), para um volume total de reação de 20 µL, de acordo com o método recomendado pelo fabricante. Aliquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), foram submetidas à PCR em tempo real utilizando-se 10 µL 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio customizado (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e antisenso e sonda Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene: miostatina (Taqman assay Rn00569683_m1; Ref. seq. Genbank NM_019151.1) e folistatina (Taqman assay Rn00561225_m1; Ref. seq. Genbank NM_012561.1). A amplificação e a análise foram realizadas utilizando o Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados de expressão gênica dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes de referência ciclofilina (Taqman assay Rn00690933_m1; Ref. seq. Genbank NM_017101.1) e β-actina (Taqman assay Rn00667869_m1 Ref. Seq. Genbank NM_031144.2). As reações

foram feitas em triplicata e a expressão gênica foi calculada pelo método do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Martinez *et al.* 2010).

Análise da expressão proteica de miostatina e folistatina por Western blot

A expressão proteica de miostatina e folistatina no músculo sóleo foi avaliada pela técnica de Western blot (Okoshi *et al.* 2004). Resumidamente, fragmento do músculo sóleo (80-100 mg) foi homogeneizado com 800 μ L de tampão RIPA, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12.000 rpm, a 4 °C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80 °C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 4 °C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmido por 90 min a 120 V, 4 °C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 2 h (bloqueio) para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpos primários anti-miostatina (N19-R: sc-6885-R; Santa Cruz Biotechnology) e anti-folistatina (H114: sc-30194; Santa Cruz Biotechnology). No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, a membrana foi incubada com Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana e submetida a auto-radiografia.

Após obtenção do filme com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à

membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário para a proteína constitutiva GAPDH (6C5: sc-32233; Santa Cruz Biotechnology). O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da auto-radiografia.

Os filmes foram escaneados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. A comparação entre os quatro grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) para o esquema fatorial 2 X 2, complementada pelo teste de Bonferroni (comparações efetuadas: Sh-Sed versus Sh-Ex, IM-Sed versus IM-Ex, Sh-Sed versus IM-Sed e Sh-Ex versus IM-Ex). A comparação do tamanho do infarto foi realizada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. A distribuição de frequência de *splittings* foi analisada pelo teste de Goodman. O nível de significância considerado foi de 5%. As análises foram realizadas com o programa SigmaStat 3.5.

RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis corporais

Na tabela 1, está apresentada a frequência dos sinais de insuficiência cardíaca nos ratos infartados. Dois ou mais sinais de insuficiência cardíaca estavam presentes em 7 dos 11 ratos do grupo IM-Sed e em 7 dos 10 animais do grupo IM-Ex. Apenas 2 ratos do grupo IM-Sed e 1 do grupo IM-Ex não apresentaram qualquer evidência clínica ou patológica de insuficiência cardíaca. Os ratos dos grupos Sh-Sed (n = 12) e Sh-Ex (n = 12) não apresentaram qualquer dos sinais compatíveis com insuficiência cardíaca.

As variáveis anatômicas estão apresentadas na tabela 2. O peso corporal final não diferiu entre os grupos. Os pesos do ventrículo esquerdo, ventrículo direito, átrios e pulmões e os pesos do ventrículo direito, átrios e pulmões normalizados pelo peso corporal foram maiores nos grupos IM-Sed e IM-Ex quando comparados aos grupos Sh-Sed e Sh-Ex, respectivamente. O peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal não diferiu entre os grupos.

Avaliação ecocardiográfica

Os resultados dos estudos ecocardiográficos estão apresentados nas tabelas 3 a 6. Previamente ao período de exercício físico, foi realizado ecocardiograma transtorácico. Após exclusão dos ratos com tamanho de infarto menor que 40% do ventrículo esquerdo, os animais infartados e os Sham foram aleatoriamente separados em grupos sedentário e exercitado. Antes do período de exercício (tabelas 3 e 4), os grupos infartados, IM-Sed e IM-Ex, apresentaram dilatação do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo, e piora da função ventricular sistólica e diastólica, quando comparados aos grupos Sh-Sed e Sh-Ex, respectivamente. Não observamos diferenças estatisticamente significantes nas variáveis ecocardiográficas analisadas entre os grupos IM-Sed e IM-Ex antes do treinamento físico.

Os parâmetros estruturais cardíacos avaliados após o período de exercícios estão apresentados na tabela 5. Os diâmetros diastólico do VE (DDVE), sistólico do VE (DSVE) e do átrio esquerdo (AE), a relação entre os diâmetros do

AE e da aorta, os valores de DDVE e AE normalizados pelo peso corporal, e a área diastólica do VE foram maiores nos grupos IM-Sed e IM-Ex quando comparados aos grupos Sh-Sed e Sh-Ex, respectivamente. Essas variáveis não diferiram significativamente entre os grupos IM-Sed e IM-Ex e entre Sh-Sed e Sh-Ex. A espessura diastólica da parede posterior do VE foi semelhante entre os grupos. O diâmetro da aorta foi menor nos grupos infartados quando comparados aos respectivos controles. A área sistólica foi maior nos grupos IM-Sed e IM-Ex comparados aos grupos Sh-Sed e Sh-Ex, respectivamente, e menor no grupo IM-Ex que no IM-Sed.

Os resultados da avaliação funcional do VE após o treinamento físico estão expostos na tabela 6. A frequência cardíaca não diferiu entre os grupos. A porcentagem de encurtamento endocárdico (ΔD), a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP) e o tempo de desaceleração da onda E (TDE) foram menores nos grupos IM quando comparados aos respectivos controles. A porcentagem de variação de área do VE foi menor nos grupos infartados em relação aos grupos Sham e maior no IM-Ex que no IM-Sed. A onda E foi maior nos grupos infartados que nos Sham e menor no Sh-Ex que no Sh-Sed e a onda A menor no IM-Sed que no Sh-Sed. O índice Tei, a relação E/A e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) aumentaram nos grupos IM quando comparados aos grupos Sham.

Análise histológica do coração

A análise histológica do coração foi realizada em cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados por picro-sirius red (figura 1). A porcentagem de área infartada do ventrículo esquerdo não diferiu entre os grupos IM-Sed ($49,8 \pm 5,10$ %; $n = 11$) e IM-Ex ($48,9 \pm 4,98$ %; $n = 10$; $p = 0,69$).

Análise histológica da musculatura esquelética

O trofismo do músculo sóleo foi avaliado por morfometria realizada em lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Não houve diferença estatística entre os quatro grupos (Sh-Sed $3.334 \pm 571 \mu\text{m}^2$, $n = 6$; Sh-Ex $3.305 \pm 374 \mu\text{m}^2$, $n = 6$; IM-Sed $3.793 \pm 186 \mu\text{m}^2$, $n = 6$; IM-Ex $3.645 \pm 349 \mu\text{m}^2$, $n = 6$; $p > 0,05$; figura 2). A frequência de células em processo de segmentação foi significativamente maior nos grupos exercitados em comparação aos sedentários e maior no grupo IM-Ex que no Sh-Ex (Sh-Sed 0,1 %, $n = 6$; Sh-Ex 2,2 %, $n = 6$; IM-Sed 0,5 %, $n = 6$; IM-Ex 6,1 %, $n = 6$; $p < 0,05$).

Avaliação da expressão gênica da miostatina e da folistatina por RT-PCR em tempo real

A expressão gênica da miostatina foi semelhante entre os quatro grupos (Sh-Sed $1,00 \pm 0,98$; Sh-Ex $0,83 \pm 0,50$; IM-Sed $0,46 \pm 0,32$; IM-Ex $0,59 \pm 0,34$ unidades arbitrárias; $p > 0,05$; figura 3). A expressão gênica da folistatina foi significativamente menor no grupo IM-Sed que nos grupos Sh-Sed e IM-Ex (Sh-Sed $1,00 \pm 0,61$; Sh-Ex $0,60 \pm 0,25$; IM-Sed $0,40 \pm 0,18$; IM-Ex $1,01 \pm 0,60$ unidades arbitrárias; figura 4).

Avaliação da expressão proteica da miostatina e da folistatina por Western blot

A expressão proteica da miostatina foi significativamente menor no grupo IM-Sed que nos grupos Sh-Sed e IM-Ex (Sh-Sed $1,00 \pm 0,35$; Sh-Ex $1,02 \pm 0,37$; IM-Sed $0,66 \pm 0,18$; IM-Ex $1,17 \pm 0,48$ unidades arbitrárias; $p < 0,05$; figura 5). A expressão proteica da folistatina não diferiu entre os grupos (Sh-Sed $1,00 \pm 0,30$; Sh-Ex $1,24 \pm 0,30$; IM-Sed $1,02 \pm 0,34$; IM-Ex $1,14 \pm 0,39$ unidades arbitrárias; $p > 0,05$; figura 6).

Tabela 1. Frequência dos sinais de insuficiência cardíaca

Variáveis	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
Taquipnéia	1	1
Congestão pulmonar	5	7
Derrame pleural e pericárdico	7	6
Ascite	6	4
Trombo em AE	2	1
Hipertrofia do VD	5	6

IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito.

Tabela 2. Parâmetros corporais dos animais

Variáveis	Sh-Sed (n = 12)	Sh-Ex (n = 12)	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
PC final (g)	496 ± 47	483 ± 42	513 ± 52	481 ± 31
VE (g)	0,819 ± 0,075	0,847 ± 0,123	0,951 ± 0,099*	0,950 ± 0,118#
VD (g)	0,266 ± 0,063	0,274 ± 0,050	0,447 ± 0,137*	0,450 ± 0,124#
Átrios (g)	0,093 ± 0,010	0,109 ± 0,021	0,283 ± 0,127*	0,238 ± 0,086#
Pulmões (g)	2,00 ± 0,26	1,97 ± 0,20	2,92 ± 0,88*	2,99 ± 0,68#
VE/PC (mg/g)	1,66 ± 0,19	1,77 ± 0,32	1,86 ± 0,20	1,98 ± 0,22
VD/PC (mg/g)	0,53 ± 0,10	0,57 ± 0,09	0,88 ± 0,28*	0,93 ± 0,25#
Átrios/PC (mg/g)	0,189 ± 0,024	0,229 ± 0,061	0,554 ± 0,244*	0,488 ± 0,153#
Pulmões/PC (mg/g)	4,05 ± 0,47	4,08 ± 0,39	5,73 ± 1,74*	6,20 ± 1,28#

Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs Sh-Sed; # p < 0,05 vs Sh-Ex. ANOVA e Bonferroni.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

Variáveis	Sh-Sed (n = 12)	Sh-Ex (n = 12)	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
DDVE(mm)	8,36 ± 0,36	8,38 ± 0,52	10,76 ± 0,57*	10,46 ± 0,88#
DDVE/PC (mm/Kg)	19,0 ± 1,62	18,2 ± 0,95	23,2 ± 1,48*	22,3 ± 1,31#
DSVE(mm)	4,03 ± 0,45	3,70 ± 0,51	8,60 ± 0,76*	8,13 ± 0,98#
EDPP(mm)	1,35 ± 0,07	1,34 ± 0,05	1,54 ± 0,15*	1,60 ± 0,17#
AO (mm)	3,69 ± 0,27	3,74 ± 0,30	3,55 ± 0,25	3,75 ± 0,25
AE (mm)	5,60 ± 0,53	5,94 ± 1,00	7,93 ± 1,05*	7,25 ± 0,75#
AE/AO	1,52 ± 0,11	1,59 ± 0,23	2,18 ± 0,35*	1,95 ± 0,26#
AE/PC (mm/Kg)	12,7 ± 1,13	12,9 ± 2,12	17,1 ± 2,24*	15,5 ± 1,95#
Área diastólica	0,54 ± 0,05	0,53 ± 0,06	0,83 ± 0,09*	0,88 ± 0,12#
Área sistólica	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,58 ± 0,06*	0,61 ± 0,10#

Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE/PC: DDVE normalizado pelo peso corporal (PC); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro de aorta; AE: diâmetro de átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; AE/PC: AE normalizado pelo PC. Média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs Sh-Sed; # p < 0,05 vs Sh-Ex. ANOVA e Bonferroni.

Tabela 4. Avaliação inicial da função do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	Sh-Sed (n = 12)	Sh-Ex (n = 12)	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
FC (bpm)	263 ± 19	275 ± 15	307 ± 48*	291 ± 38
ΔD (%)	51,9 ± 3,93	55,9 ± 4,53*	20,1 ± 4,77*	22,5 ± 4,67#
VEPP(mm/s)	34,8 ± 3,45	40,1 ± 3,90*	23,4 ± 4,87*	22,2 ± 5,48#
Δ Área (%)	69,1 ± 3,62	70,3 ± 5,16	30,2 ± 5,69*	30,3 ± 8,32#
Onda E (cm/s)	84,8 ± 9,14	80,4 ± 7,18	106,7 ± 16,17*	98,1 ± 21,39#
Onda A (cm/s)	50,3 ± 11,59	47,0 ± 8,77	52,9 ± 29,79	42,0 ± 19,40
E/A	1,75 ± 0,37	1,74 ± 0,22	2,91 ± 1,94*	2,99 ± 1,86#
TRIV (ms)	26,1 ± 5,0	23,7 ± 2,8	26,4 ± 5,6	30,7 ± 6,4#
TDE (ms)	48,7 ± 5,8	44,9 ± 7,4	38,5 ± 5,4*	37,9 ± 7,3#

Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. FC: frequência cardíaca; ΔD: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; Δ Área: porcentagem de variação de área; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E. Média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs Sh-Sed; # p < 0,05 vs Sh-Ex. ANOVA e Bonferroni.

Tabela 5. Análise ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

Variáveis	Sh-Sed (n = 12)	Sh-Ex (n = 12)	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
DDVE(mm)	8,73 ± 0,66	9,17 ± 0,34	11,79 ± 1,03*	11,26 ± 1,20#
DDVE/PC (mm/Kg)	16,8 ± 1,24	18,3 ± 1,43	22,2 ± 2,35*	22,5 ± 2,29#
DSVE(mm)	4,18 ± 0,51	4,73 ± 0,48	9,88 ± 1,41*	9,10 ± 1,47#
EDPP(mm)	1,47 ± 0,06	1,43 ± 0,10	1,57 ± 0,21	1,55 ± 0,19
AO (mm)	4,03 ± 0,23	4,21 ± 0,25	3,76 ± 0,18*	3,80 ± 0,25#
AE (mm)	6,41 ± 0,55	6,13 ± 0,53	8,58 ± 1,41*	8,15 ± 1,09#
AE/AO	1,60 ± 0,15	1,46 ± 0,13	2,29 ± 0,40*	2,16 ± 0,37#
AE/PC (mm/Kg)	12,4 ± 1,72	12,2 ± 0,94	16,2 ± 2,98*	16,2 ± 1,85#
Área diastólica	0,55 ± 0,07	0,55 ± 0,10	1,06 ± 0,16*	0,96 ± 0,23#
Área sistólica	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,82 ± 0,15*	0,68 ± 0,18#†

Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE/PC: DDVE normalizado pelo peso corporal (PC); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro de aorta; AE: diâmetro de átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; AE/PC: AE normalizado pelo PC. Média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs Sh-Sed; # p < 0,05 vs Sh-Ex; † p < 0,05 vs IM-Sed. ANOVA e Bonferroni.

Tabela 6. Avaliação final da função do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	Sh-Sed (n = 12)	Sh-Ex (n = 12)	IM-Sed (n = 11)	IM-Ex (n = 10)
FC (bpm)	268 ± 18	289 ± 45	309 ± 68	281 ± 26
ΔD (%)	52,3 ± 3,04	48,4 ± 4,80	16,5 ± 5,53*	19,6 ± 5,55#
VEPP(mm/s)	38,3 ± 3,07	36,4 ± 3,16	20,1 ± 5,33*	21,6 ± 4,91#
Δ Área (%)	70,1 ± 6,35	70,0 ± 5,69	22,8 ± 7,86*	29,7 ± 5,51#†
Tei	0,46 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,83 ± 0,14*	0,88 ± 0,25#
Onda E (cm/s)	89,1 ± 5,00	76,7 ± 9,62*	107,0 ± 16,67*	99,7 ± 19,33#
Onda A (cm/s)	60,6 ± 9,31	60,0 ± 14,75	39,8 ± 25,64*	43,7 ± 30,62
E/A	1,50 ± 0,25	1,36 ± 0,41	3,98 ± 2,53*	3,83 ± 2,68#
TRIV (ms)	25,5 ± 3,2	26,3 ± 3,6	30,8 ± 4,5*	30,9 ± 4,0#
TDE (ms)	48,5 ± 6,5	48,5 ± 7,4	36,6 ± 8,5*	37,0 ± 7,9#

Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. FC: frequência cardíaca; ΔD: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; Δ Área: porcentagem de variação de área; Tei: índice de Tei ou também conhecido por índice de performance miocárdica; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E. Média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs Sh-Sed; # p < 0,05 vs Sh-Ex; † p < 0,05 vs IM-Sed. ANOVA e Bonferroni.

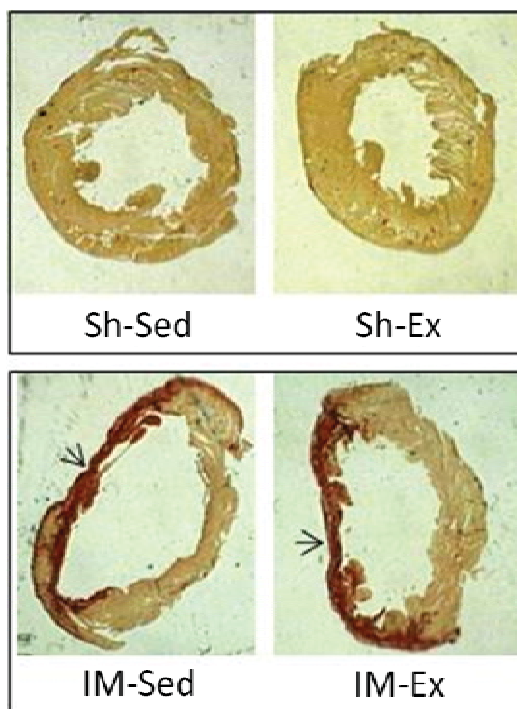


Figura 1. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados por picro-sirius red. Sh-Sed: grupo Sham sedentário, n = 12; Sh-Ex: grupo Sham exercitado, n = 12; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário, n = 11 e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado, n = 10. Setas indicam região infartada.

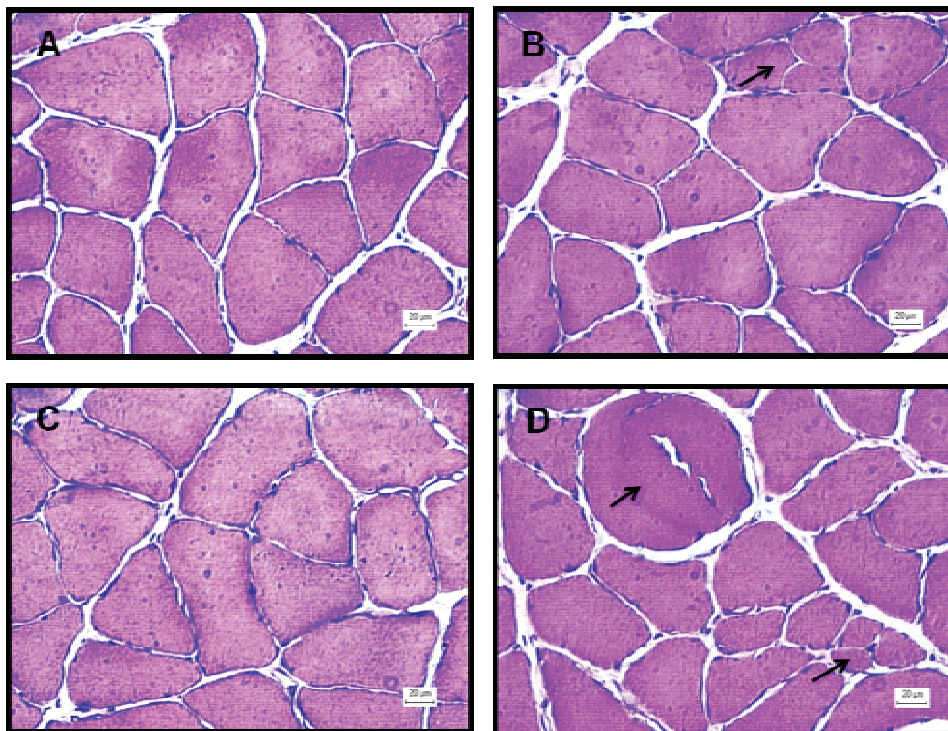


Figura 2. Cortes histológicos do músculo sóleo corados por hematoxilina-eosina. A) Grupo Sham sedentário. B) Grupo Sham exercitado. C) Grupo infarto do miocárdio sedentário. D) Grupo infarto do miocárdio exercitado. Setas indicam fibras em processo de *splitting*. Objetiva: 40X.

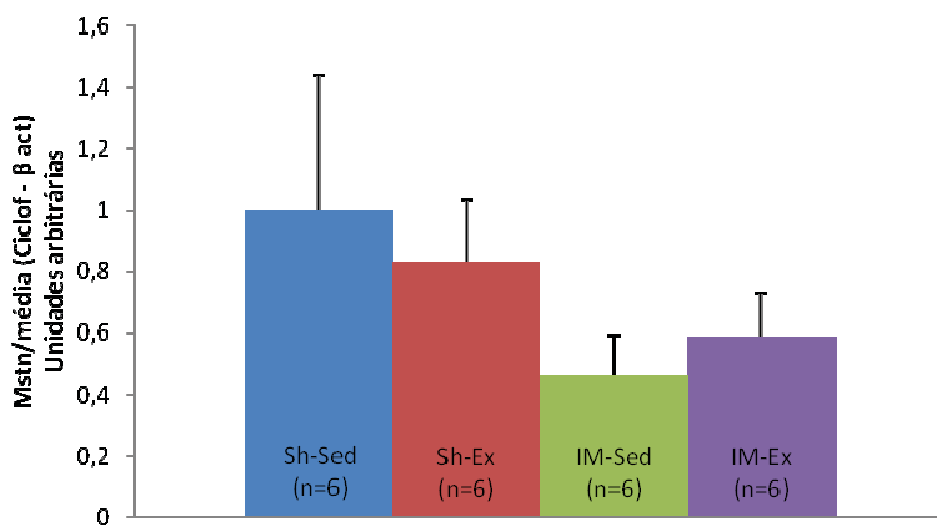


Figura 3. Expressão gênica da miostatina no músculo sóleo por RT-PCR em tempo real. Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. Mstn: miostatina; Ciclof: ciclofilina; β act: β-actina. Média \pm desvio padrão. ANOVA e Bonferroni.

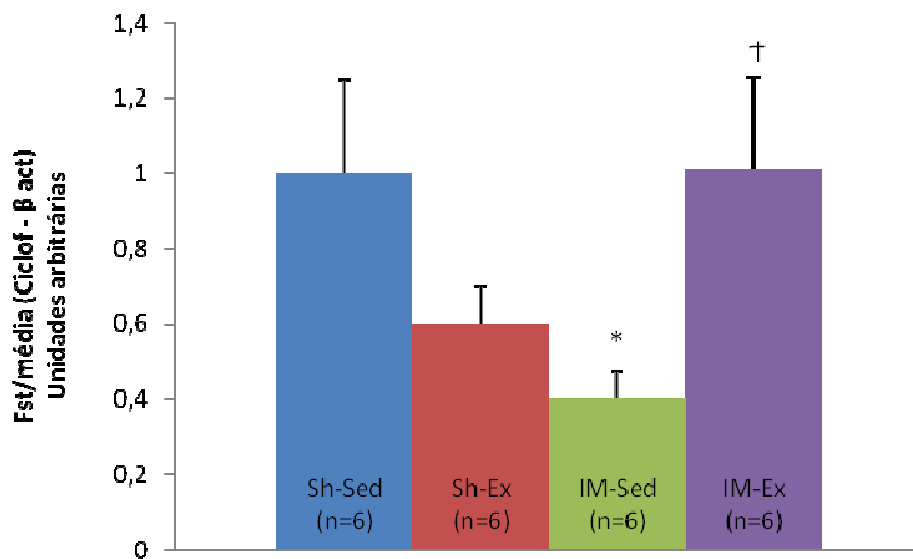


Figura 4. Expressão gênica da folistatina no músculo sóleo por RT-PCR em tempo real. Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. Fst: folistatina; Ciclof: ciclofilina; β act: β -actina. Média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs Sh-Sed; † $p < 0,05$ vs IM-Sed. ANOVA e Bonferroni.

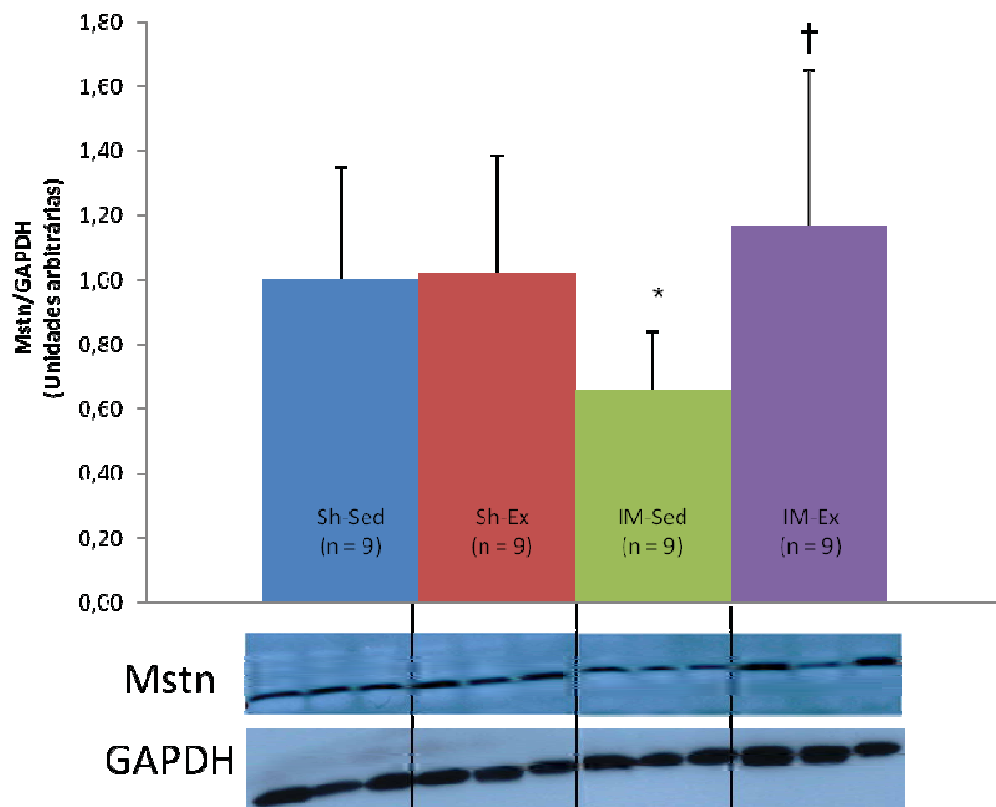


Figura 5. Expressão proteica da miostatina no músculo sóleo por Western blot. Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. Mstn: miostatina. Média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs Sh-Sed; † $p < 0.05$ vs IM-Sed. ANOVA e Bonferroni.

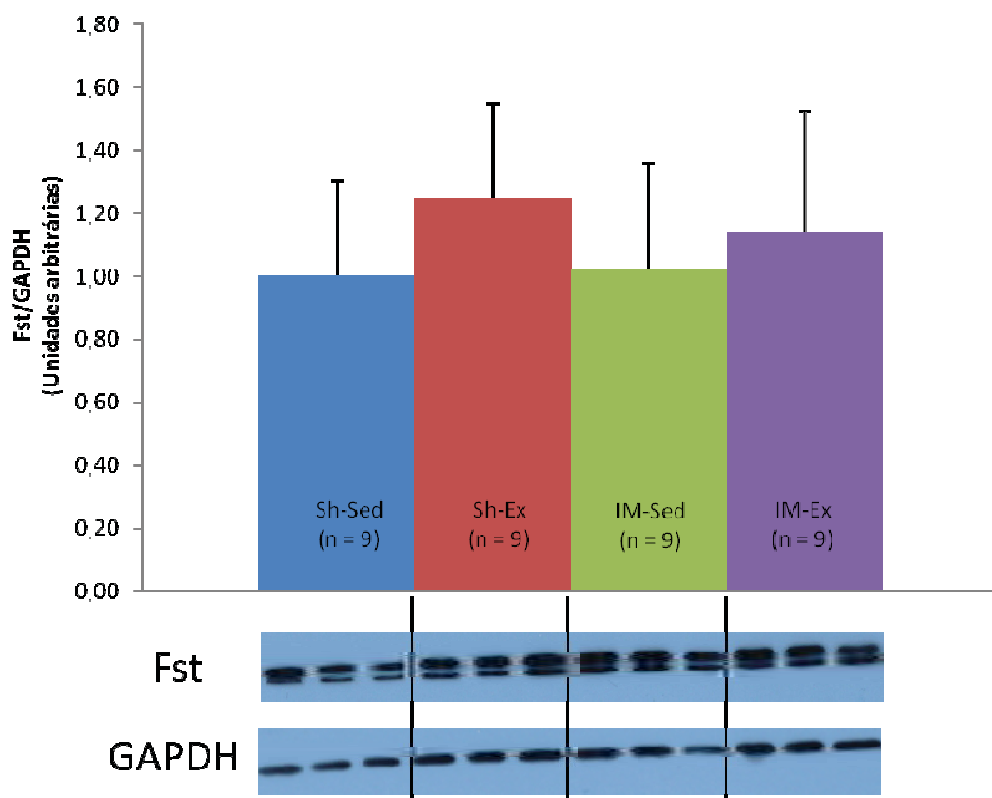


Figura 6. Expressão proteica da folistatina no músculo sóleo por Western blot. Sh-Sed: grupo Sham sedentário; Sh-Ex: grupo Sham exercitado; IM-Sed: grupo com infarto do miocárdio sedentário e IM-Ex: grupo com infarto do miocárdio exercitado. Fst: folistatina. Média \pm desvio padrão. ANOVA e Bonferroni.

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito do exercício físico tardio na expressão da miostatina e folistatina no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca causada por infarto do miocárdio. Adicionalmente, mostramos que o exercício físico resulta em efeito benéfico no processo de remodelação cardíaca após infarto, caracterizado por melhora da função sistólica do ventrículo esquerdo.

O modelo de infarto do miocárdio decorrente de ligadura da artéria coronária esquerda tem sido bastante utilizado para indução de insuficiência cardíaca em ratos (Pfeffer *et al.* 1992). O modelo, prático e de baixo custo, mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados a estudos clínicos subsequentes (Pfeffer *et al.* 1979; Pfeffer *et al.* 1992).

O diagnóstico de insuficiência cardíaca foi baseado na observação de sinais clínico e/ou anátomo-patológicos avaliados *in vivo*, como taquipnéia/respiração laboriosa, ou *pós-mortem*, como ascite, congestão hepática, derrame pleuropericárdico, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar (Cicogna *et al.* 1999, Martinez *et al.* 2011; Ribeiro *et al.* 2003; Woodiwiss *et al.* 2001). Os critérios para estabelecer o diagnóstico de insuficiência cardíaca em ratos não estão completamente definidos na literatura. Vários autores têm utilizado a presença de derrame pleural, hipertrofia do ventrículo direito ou congestão pulmonar para definir o diagnóstico em ratos (Bing *et al.* 1995; Brooks *et al.* 1997; Cicogna *et al.* 1999; Conrad *et al.* 1995; Martinez *et al.* 2011; Woodiwiss *et al.* 2001). Neste estudo, sete dos onze ratos do grupo IM-Sed e sete dos dez do grupo IM-Ex apresentaram dois ou mais dos sinais acima descritos, o que permite caracterizar esses ratos como portadores de insuficiência cardíaca. Portanto, a ocorrência de insuficiência cardíaca, semelhante em ambos os grupos infartados, não foi reduzida pelo treinamento físico.

O tamanho do infarto do miocárdio é fator determinante para o desenvolvimento de remodelação e insuficiência cardíaca pós-infarto, tanto em humanos quanto em animais de experimentação. Como nosso objetivo foi avaliar os efeitos do exercício físico sobre o músculo esquelético durante a insuficiência

cardíaca, neste estudo foram incluídos apenas ratos com área infartada maior que 40% da área total do ventrículo esquerdo. O tamanho do infarto foi estimado três meses após a cirurgia, por ecocardiograma transtorácico, e confirmado *post-mortem*, por análise histológica. O ecocardiograma realizado antes do período de exercícios também permitiu constatar que os grupos IM-Sed e IM-Ex apresentavam grau semelhante de comprometimento cardíaco pós-infarto, uma vez que as variáveis analisadas não diferiram significativamente entre esses grupos.

O infarto do miocárdio pode iniciar cascata progressiva de mudanças estruturais e geométricas no ventrículo esquerdo, resultando em remodelação cardíaca patológica, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (Litwin *et al.* 1994; Martinez *et al.* 2011; Pfeffer *et al.* 1992; Zornoff *et al.* 2000). Neste estudo, as alterações cardíacas pós-infarto foram avaliadas por ecocardiograma transtorácico. O grupo IM-Sed apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparado ao Sh-Sed. O treinamento físico induziu melhora da função sistólica, caracterizada pelo aumento da porcentagem de variação da área do ventrículo esquerdo em relação ao grupo IM-Sed. No infarto do miocárdio, a porcentagem de variação da área é considerada o melhor índice para avaliar a função sistólica do ventrículo esquerdo (Solomon *et al.* 1999). Portanto, podemos concluir que o exercício aeróbio tardio atenuou o desenvolvimento de disfunção ventricular sistólica pós-infarto. Nosso resultado está de acordo com dados de estudos prévios, nos quais o treinamento físico atenuou anormalidades cardíacas estruturais, funcionais ou moleculares decorrentes do infarto do miocárdio (Galvão *et al.* 2011; Jorge *et al.* 2011; Mou *et al.* 2009; Wisloff *et al.* 2002). Além disso, recente metanálise mostrou que programas de reabilitação cardíaca baseados em exercícios físicos após infarto do miocárdio, estão associados a redução na mortalidade e reinfarto (Lawler *et al.* 2011).

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo sóleo. Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que este músculo é sensível a alterações induzidas por insuficiência cardíaca aguda (Carvalho *et al.* 2003) ou crônica (Lima *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2010).

Neste estudo, observamos que o grupo IM-Sed apresentou redução da expressão proteica da miostatina. Sua expressão gênica, embora totalizando 46 % do valor observado no Sh-Sed, não foi estatisticamente diferente entre os quatro grupos experimentais. Esse fato é devido, provavelmente, à grande variabilidade dos resultados obtidos e ao tamanho amostral para essa análise. Embora a expressão gênica da folistatina tenha sido reduzida no grupo IM-Sed, a expressão proteica não diferiu entre os grupos.

Os estudos sobre a expressão da miostatina na insuficiência cardíaca têm mostrado resultados divergentes. Em estudo prévio, Lima *et al.* (2010) observaram que ratos com infarto do miocárdio apresentaram atrofia muscular acompanhada de preservação da expressão proteica da miostatina com redução da folistatina, sugerindo que o antagonismo reduzido da miostatina possa ter colaborado na atrofia muscular. No mesmo modelo experimental, Lenk *et al.* (2009) encontraram aumento da expressão proteica da miostatina. Embora sem avaliar o trofismo muscular, os autores chamaram a atenção para o fato que seus resultados estavam de acordo com o esperado, uma vez que atrofia muscular é habitualmente encontrada na insuficiência cardíaca e o aumento da miostatina poderia estar envolvido neste fenótipo muscular. Em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca, observamos importante atrofia muscular associada a redução da expressão da miostatina e da folistatina, também sugerindo que o antagonismo reduzido da miostatina possa ter tido papel na atrofia muscular (Damatto *et al.* 2012).

No presente estudo, não observamos atrofia muscular, alteração frequentemente observada na insuficiência cardíaca (Anker & Coats 1999; Mancini *et al.* 1992; Schieffer *et al.* 1995). Em trabalhos prévios com insuficiência cardíaca causada por infarto do miocárdio (Lima *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2010), ou por hipertensão arterial sistêmica (Damatto *et al.* 2012) ou pulmonar (Carvalho *et al.* 2003), detectamos redução da área seccional de fibras do músculo sóleo. É possível que, no presente estudo, apesar das importantes alterações cardíacas detectadas ao ecocardiograma, os ratos não estivessem em grau tão avançado de insuficiência cardíaca como nos estudos anteriores. Reforçando essa hipótese, observamos que não houve alteração no

peso corporal dos ratos ao final do experimento. Uma importante característica da insuficiência cardíaca avançada, tanto em humanos (Anker & Coats 1999; Okoshi *et al.* 2000; Okoshi *et al.* 2001), como em animais de experimentação (Damatto *et al.* 2012; Martinez *et al.* 2010), é o desenvolvimento de caquexia.

A miostatina regula negativamente a massa muscular por redução na síntese proteica, principalmente, de mioblastos e miotubos (McPherron *et al.* 1997), e por aumento na degradação de proteínas musculares (McFarlane *et al.* 2006). Além disso, pode inibir o processo de proliferação e diferenciação de células miossatélites, que é regulado, em parte, pelos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 (Langley *et al.* 2002), com consequente atrofia muscular (McFarlane *et al.* 2006). Estudos sugerem que a miostatina inibe a expressão dos fatores regulatórios músculo-específicos, principalmente MyoD e miogenina (Langley *et al.* 2002; McFarlane *et al.* 2006). A redução no crescimento celular causada pela miostatina não parece ser dependente de indução de apoptose na fibra muscular (Joulia-Ekaza & Cabello 2006). No presente estudo, é provável que redução na expressão da miostatina no grupo IM-Sed tenha favorecido a proliferação de células satélites e contribuído para a manutenção do trofismo muscular.

O treinamento físico, iniciado tardiamente após o infarto do miocárdio, impediu alterações na expressão da miostatina e folistatina no músculo sóleo sem, no entanto, modificar o trofismo muscular.

À análise histológica, observamos aumento da frequência de fibras em processo de segmentação celular, fenômeno conhecido como *splitting*, nos grupos exercitados em comparação aos sedentários. Adicionalmente, o grupo IM-Ex apresentou maior frequência de *splitting* que o Sh-Ex. O processo de *splitting* caracteriza a divisão longitudinal de fibras musculares ou a fusão incompleta de células satélites proliferadas após lesão de fibras musculares, condições que podem indicar a presença de hiperplasia (Eriksson *et al.* 2006). Acredita-se que vários fatores possam desencadear o fenômeno como, por exemplo, estresse provocado por exercícios físicos, estresse metabólico e alterações da microcirculação (Camargo Filho *et al.* 2005; Eriksson *et al.* 2006). Não identificamos estudos que tenham avaliado o processo de *splitting* em músculos

esqueléticos durante a insuficiência cardíaca. O fato do *splitting* ter sido mais frequente no grupo IM-Ex que no Sh-Ex sugere que alterações relacionadas à insuficiência cardíaca possam estar envolvidas no fenômeno. No miocárdio de ratos hipertensos submetidos a restrição da ingestão calórica, observamos importante processo de segmentação celular, o que não foi detectado no coração de ratos normotensos também submetidos a restrição calórica (Okoshi *et al.* 2002; Okoshi *et al.* 2004). Esses resultados reforçam a possibilidade que alterações neurohormonais ou inflamatórias associadas à insuficiência cardíaca (Comini *et al.* 1999; Kazory 2010; Levine *et al.* 1990) estejam envolvidas no fenômeno.

A influência do exercício sobre a expressão da miostatina ainda não está completamente esclarecida. Como já referido, camundongos com deleção do gene para a miostatina apresentam aumento da massa muscular (Savage *et al.* 2010). Entretanto, o incremento da massa não é acompanhado por aumento proporcional da força de contração (Amthor *et al.* 2007; Gentry *et al.* 2011; Matsakas *et al.* 2011; Mendias *et al.* 2006). Além disso, os animais transgênicos possuem menor capacidade aeróbia (Savage *et al.* 2010). Interessantemente, quando submetidos a programa de exercícios físicos aeróbios, os camundongos com deleção do gene para a miostatina apresentam redução do grau de hipertrofia (Matsakas *et al.* 2011; Savage *et al.* 2010) e aumento da força muscular (Matsakas *et al.* 2011). Além disso, exibem aumento da atividade da citrato sintetase, semelhantemente ao observado em camundongos controle (Savage *et al.* 2010). Os resultados desses estudos permitiram concluir que os músculos de animais com deleção da miostatina mantêm a plasticidade metabólica para se adaptarem normalmente ao treinamento físico aeróbio (Savage *et al.* 2010).

Estudos experimentais com ratos saudáveis apresentaram resultados contraditórios em relação à modulação da miostatina pelo treinamento físico. Após exercícios aeróbios, foi observada redução da expressão gênica da miostatina nos músculos gastrocnêmio e vasto lateral (Matsakas *et al.* 2006). Por outro lado, a expressão foi aumentada 30 minutos após única sessão excêntrica de exercícios

(Peters *et al.* 2003) e após treinamento de resistência (Willoughby 2004), que também induziu elevação de sua concentração sérica.

No cenário clínico, estudos realizados com homens jovens ou idosos, treinados ou não, mostraram que a expressão gênica da miostatina diminui após treinamento resistido (Hulmi *et al.* 2008; Mascher *et al.* 2007). Por outro lado, em mulheres saudáveis, a expressão gênica de miostatina e folistatina não foi alterada por exercícios físicos, tanto excêntricos como concêntricos (Jensky *et al.* 2010).

Poucos estudos avaliaram os efeitos do exercício físico sobre a expressão da miostatina durante a insuficiência cardíaca. Em ratos com infarto do miocárdio, Lenk *et al.* (2009) observaram que o treinamento aeróbio reduziu a expressão de miostatina, que se encontrava aumentada nos animais infartados sedentários. Posteriormente, os próprios autores (Lenk *et al.* 2012) confirmaram os resultados de seus achados experimentais em pacientes com insuficiência cardíaca. A expressão gênica e proteica da miostatina foi aumentada em músculo esquelético de doentes com insuficiência cardíaca quando comparados a adultos saudáveis, e reduzida após período de treinamento físico (Lenk *et al.* 2012).

A sinalização intracelular decorrente da estimulação pela miostatina ainda não está completamente elucidada. Estudos sugerem que a miostatina interage com os receptores de membrana activina tipo II (Act RII e Act RIIB) e, em menor intensidade, com o receptor Act RIIA (Lee 2004; Lee *et al.* 2005; Lee & McPherron 2001). Em cultura de mioblastos, a adição de miostatina promove bloqueio da miogênese pela regulação negativa na expressão do fator transcricional paired box 3 e inibição na expressão da MyoD (McFarlane *et al.* 2006). Além de bloquear a miogênese, a miostatina promove aumento na degradação de proteínas musculares por meio de ativação de sistemas proteolíticos, incluindo o sistema da ubiquitina. A degradação proteica é mediada por diversos mecanismos como hipofosforilação da forkhead box O1, inibição da sinalização pela via fosfoinositol-3-quinase, proteína quinase serina e treonina, e estimulação da atrogina e de outros genes relacionados à atrofia muscular (McFarlane *et al.* 2006).

Neste estudo, foi inesperado o achado de redução da expressão proteica da miostatina nos ratos do grupo IM-Sed. Entretanto, o resultado é consistente com a preservação do trofismo do músculo sóleo nos ratos deste grupo, uma vez que a concentração diminuída da miostatina pode ter evitado a atrofia muscular. O fato da expressão da miostatina ter se normalizado no grupo IM-Ex sugere que o treinamento físico resulta em efeito benéfico na musculatura esquelética, mesmo em fase que antecede o desenvolvimento de atrofia muscular associada à insuficiência cardíaca.

Em conclusão, o treinamento físico aeróbio tardio melhora a função sistólica do ventrículo esquerdo de ratos infartados e impede alterações na expressão das proteínas miostatina e folistatina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albanesi Filho FM. O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil? *Arq Bras Cardiol.* 2005;85:155-156.
- Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbóva G, Partridge T, Zammit P, Bunger L, Patel K. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:1835-1840.
- 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.
- Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia: A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest.* 1999;115:836-847.
- Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
- Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1997;96:4002-4010.
- Brum PC, Bacurau AVN, Medeiros A, Ferreira JCB, Vanzelli AS, Negrão CE. Aerobic exercise training in heart failure: impacto n sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:827-835.
- Camargo Filho JCS; Vanderlei LCM; Camargo RCT; Oliveira DAR; Oliveira Jr SA; Dal Pai V; Belangero WD. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq Ciênc Saúde.* 2005;12:196-199.

- 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.
- Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, Assis JM, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-Silva MD. 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.
- Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OH. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;33:60-65.
- Clark AL, Swan JW, Laney R, Connelly M, Somerville J, Coats AJ. The role of right and left ventricular function in the ventilatory response to exercise in chronic heart failure. *Circulation.* 1994;89:2062-2069.
- 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.
- Comini L, Bachetti T, Agnoletti L, Gaia G, Curello S, Milanese B, Volterrani M, Parrinello G, Ceconi C, Giordano A, Corti A, Ferrari R. Induction of functional inducible nitric oxide synthase in monocytes of patients with congestive heart failure. Link with tumour necrosis factor-alpha. *Eur Heart J.* 1999;20:1503-1513.
- 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.
- Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatani BT, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2012; submetido após revisão.
- Downing J, Balady GJ. The role of exercise training in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:561-569.

- Dubowitz V. *Muscle Biopsy: a Practical Approach*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall. 1985.
- Eriksson A, Lindström M, Carlsson L, Thornell LE. Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters; fiber splitting or defect regeneration? *Histochem Cell Biol*. 2006;126:409-417.
- 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.
- Galvão TF, Matos KC, Brum PC, Negrão CE, Luz PL, Chagas AC. Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system. *Clinics*. 2011;66:151-157.
- Gentry BA, Ferreira JA, Phillips CL, Brown M. Hindlimb skeletal muscle function in myostatin-deficient mice. *Muscle Nerve*. 2011;43:49-57.
- Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E. Clinical aspects of heart failure: pulmonary edema, high-output failure. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, eds. *Braunwald's Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005;539-568.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Hikim IS, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14938-14943.
- Guizoni DM, Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Okoshi K, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. *Rev Bras Clin Med*. 2010;8:266-271.
- Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1758-1764.

- 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.
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y. The myostatin propeptide and follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem*. 2002;277:40735-40741.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol*. 2003;17:1144-1154.
- Hulmi JJ, Kovanen V, Lisko I, Selänne H, Mero AA. The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expression responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. *Eur J Appl Physiol*. 2008;102:205-213.
- Jensky NE, Sima JK, Dieli-Conwight CM, Sattler FR, Rice JC, Schroeder ET. Exercise does not influence myostatin and follistatin mRNA expression in young women. *J Strength Cond Res*. 2010;24:522-530.
- Jorge L, Rodrigues B, Rosa KT, Malfitano C, Loureiro TC, Medeiros A, Curi R, Brum PC, Lacchini S, Montano N, De Angelis K, Irigoyen MC. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *Eur Heart J*. 2011;32:904-912.
- Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*. 2006;312:2401-2414.
- Kalkman EAJ, van Suylen RJ, van Disk JPM, Saxena PR, Schoemaker RG. Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodelling after coronary artery ligation in rat. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:2483-2494.

- Kazory A. Emergence of blood urea nitrogen as a biomarker of neurohormonal activation in heart failure. *Am J Cardiol.* 2010;106:694-700.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18:1440-1463.
- 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.
- Lawler PR, Filion KB, Eisenberg MJ. Efficacy of exercise-based cardiac rehabilitation post-myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J.* 2011;162:571-584.
- Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9306-9311.
- Lee S-J, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:18117-18122.
- Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:61- 86.
- Lenk K, Erbs S, Höllriege R, Beck E, Linke A, Gielen S, Möbius Winkler S, Sandri M, Hambrecht R, Schuler G, Adams V. Exercise training leads to a reduction of elevated myostatin levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2012; *in press.*

- 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.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-241.
- Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr AS, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Inl J Exp Pathol.* 2010;91:54-62.
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994;89:345-354.
- 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.
- Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit.* 2010;16:374-383.
- Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551.
- Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E43-E51.

- Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello F, Patruno M. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. *Exp Physiol*. 2006;91:983-994.
- Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, Sartori R, Amthor H, Sandri M, Narkar V, Patel K. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Exp Physiol*. 2011;97:125-140.
- McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006;209:501-514.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387:83-90.
- 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.
- Mendias CL, Marcin JE, Calerdon DR, Faulkner JA. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J Appl Physiol*. 2006;101:898-905.
- Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva AS, Zornoff LA. Comparison of different methods to measure experimental chronic infarction size in the rat model. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89:83-87.
- Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardio Res*. 2009;81:555-564.
- 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.
- Oh BH, Ono S, Rockman HR, Ross J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation*. 1993;87:598-607.
- Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, Matsubara BB. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:607-613.
- 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.
- Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med*. 2001;58:742-749.
- Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Tratamento da caquexia associada à insuficiência cardíaca. *Rev Bras Clín Terap*. 2000;26:98-101.
- 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.
- Peters D, Barash IA, Burdi M, Yuan PS, Mathew L, Fridén J, Lieber RL. Asynchronous functional, cellular and transcriptional changes after a bout of eccentric exercise in the rat. *J Physiol*. 2003;553:947-957.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 1992;327:669-677.

- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-512.
- Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24:893-899.
- Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, Aragon FF, Jamas E, Okoshi MP. Estudo evolutivo do coração de ratos submetidos a estenose aórtica supravalvar. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81:569-575.
- Rossi Neto JM. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004;14:1-9.
- Savage KJ, McPherron AC. Endurance exercise training in myostatin null mice. *Muscle Nerve*. 2010;42:355-362.
- Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1995;269:1507-1513.
- Smith SA, Williams MA, Mitchell JH, Mammen PPA, Garry MG. The capsaicin-sensitive afferent neuron in skeletal muscle is abnormal in heart failure. *Circulation*. 2005;111:2056-2065.
- Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail*. 1999;5:213-223.
- Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol*. 2005;37:1938-1947.

- 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.
- Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990;81:518-527.
- Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 1997;10:169-78.
- Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman MG, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;291:701-706.
- Willoughby DS. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36:574-582.
- Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardio Res*. 2002;54:162-174.
- Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, Tjonna AE, Helgerud J, Slordahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen O, Skjaerpe T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation*. 2007;115:3086-3094.
- Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rats models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. 2001;103:155-160.

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.

Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SAR, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:208-214.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

Disciplinas cursadas

Estatística Aplicada à Metodologia da Investigação Científica

Responsável: Prof. Adj. Sérgio Alberto Rupp de Paiva, 1º semestre de 2010, carga horária: 60 horas.

Metodologia da Investigação Científica

Responsável: Prof. Titular Álvaro Oscar Campana, 1º semestre de 2010, carga horária: 75 horas.

Seminários de Trabalhos Científicos

1º e 2º semestres de 2010 e 1º semestre de 2011, carga horária: 135 horas.

Modelos Experimentais para o Estudo da Isquemia Miocárdica

Responsável: Prof. Adj. Leonardo Antonio Mamede Zornoff, 1º semestre de 2010, carga horária: 45 horas.

Como Caracterizar a Função de uma Mutação

Responsável: Prof. Dr. Peter Kopp, 2º semestre de 2010, carga horária: 30 horas.

Matriz Colágena Intersticial Miocárdica: Morfologia e Função

Responsável: Prof. Adj. Luiz Shiguero Matsubara, 1º semestre de 2011, carga horária: 60 horas.

Insuficiência Cardíaca e Caquexia. Mecanismos Fisiopatológicos, Prevenção e Tratamento

Responsável: Profa. Adj. Marina Politi Okoshi, 2º semestre de 2011, carga horária: 60 horas.

Participação em Reuniões Científicas

European Society Cardiology Congress 2011

Realizado em Paris, França, 2011.

Experimental Biology 2011

Realizado em Wasngington DC, 2011.

XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo

Realizado em São Paulo-SP, 2011.

IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca

Realizado em Curitiba-PR, 2010.

62ª Reunião da SBPC

Realizada em Natal-RN, 2010.

Artigos publicados

Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, **Guizoni DM**, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr AS, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol* 2010; 91: 54-62.

Guizoni DM, Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Okoshi K, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. *Rev Soc Bras Clin Med* 2010; 8: 266-271.

Minicucci MF, Azevedo POS, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, **Guizoni DM**, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SAR, Zornoff LAM. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol* 2011; 151: 242-243.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol* 2011; 111: 543-551.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, **Guizoni DM**, Bonomo C, Nakatani BT, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol*; submetido após revisão.

Trabalhos apresentados em Congressos e Reuniões Científicas

Guizoni DM, Martinez PF, Bonomo C, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Oliveira Jr SA, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Cardiac effects of late exercise training in rats with different sizes of myocardial infarction. European Society Cardiology Congress 2011, Paris, França. Resumo publicado: *Eur Heart J* 2011; 32: 609.

Martinez PF, **Guizoni DM**, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB participation in skeletal muscle response to oxidative stress in rats with heart failure. European Society Cardiology Congress 2011, Paris, França. Resumo publicado: *Eur Heart J* 2011; 32: 613.

Damatto RL, Martinez PF, **Guizoni DM**, Moretto FCF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Bonomo C, Okoshi K, Okoshi MP. Myocardial myostatin and follistatin protein expression in spontaneously hypertensive rats with heart failure. European Society Cardiology Congress 2011, Paris, França. Resumo publicado: *Eur Heart J* 2011; 32: 610.

Guizoni DM, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Damatto RL, Cezar MDM, Oliveira Jr SA, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Efeitos cardíacos do exercício físico tardio em ratos com diferentes tamanhos de infarto do miocárdio. XXXII Congresso

da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 21: 144.

Cezar MDM, Damatto RL, Campos DHS, Martinez PF, Lima ARR, **Guizoni DM**, Bonomo C, Blotta DA, Okoshi MP, Okoshi K. Espirilactona atenua o remodelamento cardíaco e melhora o desempenho miocárdico em ratos espontaneamente hipertensos sem insuficiência cardíaca. XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 21: 99.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Nakatani BT, **Guizoni DM**, Bonomo C, Guirado GN, Okoshi K, Okoshi MP. Atrofia muscular e alterações da expressão de miostatina e follistatina em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca. XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 21: 100.

Oliveira Jr AS, **Guizoni DM**, Martinez PF, Torres BP, Campos DHS, Okoshi K, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-silva MD, Cicogna AC. O bloqueio da angiotensina II ameniza o remodelamento cardíaco decorrente da obesidade. XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 21: 108.

Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, **Guizoni DM**, Bonomo C, Zornoff LAM, Rosa CM, Campana AO, Pai-Silva MD, Okoshi K, Okoshi MP. Myosin heavy chain changes in heart failure rat diaphragm muscle are not related to myogenic regulatory factors expression. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington, D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 1000.14.

Guizoni DM, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Damatto RL, Cezar MDM, Oliveira Jr SA, Zornoff LAM, Campana AO, Okoshi K, Okoshi MP. Cardiac effects of late exercise training in rats with different sizes of myocardial infarction. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 1000.15.

Bonomo C, **Guizoni DM**, Martinez PF, Lima ARR, Zornoff LAM, Cezar MDM, Damatto RL, Rosa CM, Campana AO, Okoshi K, Okoshi MP. Effects of administration of physiological doses of thyroid hormone on cardiac remodeling in rats with myocardial infarction. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 1000.5.

Cezar MDM, Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Rosa CM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Blotta DA, Gimenes R, Cicogna AC, Campana AO, Okoshi MP, Okoshi K. Spironolactone increases myocardial performance and reduces right ventricular and atrial weights in spontaneously hypertensive rats. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 1000.12.

Martinez PF, Seiva FRF, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Oliveira Jr SA, Zornoff LAM, Okoshi K, Novelli ELB, Campana AO, Okoshi MP. Influence of n-acetylcysteine on systemic and local skeletal muscle oxidative stress

in rats with heart failure. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington, D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 1000.13.

Oliveira Jr SA, **Guizoni DM**, Torres BP, Martinez PF, Fernandes T, Oliveira EM, Campana AO, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Angiotensin II blockade attenuates metabolic and cardiovascular changes in rats with diet-induced obesity. Experimental Biology Meeting, 2011, Washington, D.C. Resumo publicado: Faseb J 2011; 25: 848.9.

Guizoni DM, Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Expressão da miostatina e follistatina em músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica. 62^a Reunião da SBPC, 2010, Natal. Resumo publicado: Anais do evento.

Blotta DA, Cezar MDM, Campos DHS, Takamoto AHR, Gimenes R, Rosa CM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Okoshi MP, Okoshi K. Espirolactona reduz a hipertrofia ventricular esquerda e a mortalidade em ratos espontaneamente hipertensos sem insuficiência cardíaca. XIX Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2010, Botucatu. Resumo publicado: Anais do evento.

Bonomo C, **Guizoni DM**, Martinez PF, Lima ARR, Zornoff LAM, Cezar MDM, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Effect of administration of physiological doses of thyroid hormone on cardiac remodeling in rats with myocardial infarction. VI Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010, Botucatu. Resumo publicado: Anais do evento.

Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Zornoff LAM, Cezar MDM, **Guizoni DM**, Bonomo C, Rosa CM, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced myosin heavy chain changes in rat diaphragm muscle are not related to gene expression of myogenic regulatory factors. European Society of Cardiology Congress, 2010, Stockholm. Resumo publicado: Eur Heart J 2011; 31: 426.

Cezar MDM, Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Bonomo C, Rosa CM, **Guizoni DM**, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Spironolactone reduces mortality rate without changing left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. European Society of Cardiology Congress, 2010, Stockholm. Resumo publicado: Eur Heart J 2011; 31: 859.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, **Guizoni DM**, Bonomo C, Okoshi K, Okoshi MP. Myogenic regulatory factors and myostatin/follistatin expression in heart failure-induced skeletal muscle phenotype changes. European Society of Cardiology Congress, 2010, Stockholm. Resumo publicado: Eur Heart J 2011; 31: 427.

Damatto RL, Martinez PF, Cezar MDM, Lima ARR, **Guizoni DM**, Bonomo C, Guirado GN, Campos DHS, Okoshi K, Okoshi MP. A insuficiência cardíaca crônica altera a expressão gênica da miogenina e myod em músculo esquelético periférico. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 20: 56.

Xavier NP, Rosa CM, Fernandes AAH, Campos DHS, Gimenes C, Bonomo C, **Guizoni DM**, Takamoto AHR, Okoshi MP, Okoshi K. O antioxidante quercitina reduz o estresse oxidativo e melhora a função ventricular e miocárdica de ratos diabéticos. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo-SP. Resumo publicado: Rev Soc Cardiol Estado São Paulo 2011; 20: 12.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, **Guizoni DM**, Bonomo C, Carvalho RF, Pai-Silva MD, Okoshi K, Okoshi MP. Alteração na expressão dos fatores de regulação miogênica e da via miostatina/folistatina em músculo esquelético periférico de ratos espontaneamente hipertensos. 65º Congresso Brasileiro de Cardiologia, 2010, Belo Horizonte-MG. Resumo publicado: Arq Bras Cardiol 2010; 95: 84.

Damatto RL, Martinez PF, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Guirado GN, Pai-Silva MD, Okoshi K, Nakatani BT, Carvalho RF, Okoshi MP. Alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica e das proteínas miostatina e folistatina no músculo esquelético de ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba-PR. Resumo publicado: Arq Bras Cardiol 2010; 95: e59.

Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, **Guizoni DM**, Bonomo C, Zornoff LAM, Pai-Silva MD, Okoshi K, Okoshi MP. Estudo morfológico e molecular do músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca crônica. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba-PR. Resumo publicado: Arq Bras Cardiol 2010; 95: e53.

Martinez PF, Okoshi K, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Oliveira Jr SA, Rosa CM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Zornoff LAM, Okoshi MP. Influência da N-acetilcisteína sobre o processo de remodelação cardíaca de ratos infartados. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba-PR. Resumo publicado: Arq Bras Cardiol 2010; 95: 51.

Prêmios e Títulos

Lima ARR, Martinez PF, Damatto RL, Cezar MDM, **Guizoni DM**, Bonomo C, Zornoff LAM, Pai-Silva MD, Okoshi K, Okoshi MP. Estudo morfológico e molecular do músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca crônica. Melhor Tema Livre na Área Experimental/Ciência Básica. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba.

Martinez PF, Okoshi K, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Oliveira Jr SA, Rosa CM, Bonomo C, **Guizoni DM**, Zornoff LAM, Okoshi MP. Influência da N-acetilcisteína sobre o processo de remodelação cardíaca de ratos infartados. Selecionado entre os três melhores temas livres na área Experimental/Ciência Básica. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba.

Bonomo C, **Guizoni DM**, Martinez PF, Lima ARR, Zornoff LAM, Cezar MDM, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Effect of administration of physiological doses of thyroid hormone on cardiac remodeling in rats with myocardial infarction. Melhor tema livre na categoria trabalhos experimentais e demais não clínicos. VI Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010, Botucatu.

Xavier NP, Rosa CM, Fernandes AAH, Campos DHS, Gimenes C, Bonomo C, **Guizoni DM**, Takamoto AHR, Okoshi MP, Okoshi K. O antioxidante quercitina reduz o estresse oxidativo e melhora a função ventricular e miocárdica de ratos diabéticos. Prêmio Jovem Pesquisador "Josef Fehér". XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo.