



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

Vítor Loureiro da Silva

**Participação do trânsito de cálcio e suas proteínas reguladoras
na melhoria da função cardíaca de ratos com estenose aórtica
supraavalar e disfunção ventricular submetidos a treinamento
físico**

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

Orientador: Prof. Emérito Dr. Antonio Carlos Cicogna

Botucatu
2019

Vítor Loureiro da Silva

Participação do trânsito de cálcio e suas proteínas reguladoras
na melhoria da função cardíaca de ratos com estenose aórtica
supravalvar e disfunção ventricular submetidos a treinamento
físico

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

Orientador: Prof. Emérito Dr. Antonio Carlos Cicogna

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Silva, Vítor Loureiro da.

Participação do trânsito de cálcio e suas proteínas reguladoras na melhoria da função cardíaca de ratos com estenose aórtica supravalvar e disfunção ventricular submetidos a treinamento físico / Vítor Loureiro da Silva. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Cicogna

Capes: 40101002

1. Estenose da válvula aórtica. 2. Testes funcionais do coração. 3. Coração - Hipertrofia. 4. Exercício. 5. Cálcio - Efeito fisiológico.

Palavras-chave: Estenose aórtica; Função cardíaca; Hipertrofia fisiológica; Trânsito de cálcio; Treinamento físico aeróbio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, por toda contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela oportunidade e pelo tempo de parceria. Sem dúvidas, fica uma grande amizade para o resto da vida.

À minha esposa Vanessa e ao meu filho Pedro, por existirem e por todo suporte durante os 4 anos de desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, pelo companheirismo mesmo à distância, por toda a ajuda concedida durante o período do curso.

Às minhas irmãs, pela parceria eterna.

Aos colegas de laboratório, em especial Dijon, Gustavo e Sérgio, pela parceria para o desenvolvimento da pesquisa.

À Prof. Dr^a. Silmeia, pela realização dos exames ecocardiográficos e pelo suporte teórico para melhor compreensão da técnica.

Ao Prof. Dr. André Soares Leopoldo por ceder o espaço do laboratório para a realização da técnica do cardiomiócito isolado, e aos alunos Alexandre Barroso e Priscila Murucci pela contribuição durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Minicucci e à Prof. Dr^a. Marina Okoshi pelas contribuições no Exame de Qualificação.

Aos funcionários da UNIPEX, pela colaboração e suporte técnico.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho (processo 2015/20013-5).

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a concretização desta tese. Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“A crítica é o ponto de partida da reconstrução pessoal e social.”

(Arantxa Ugartetxea)

RESUMO

Introdução: Diversos modelos experimentais têm avaliado o processo de remodelação cardíaca (RC); dentre eles, destaca-se a indução à estenose aórtica supra-avalvar (EAo). Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca incluem alterações no trânsito de cálcio (Ca^{2+}) e em suas proteínas regulatórias. O treinamento físico (TF) tem sido utilizado na terapêutica das cardiopatias. Na patologia cardíaca por sobrecarga pressórica, o TF restaura, total ou parcialmente, a atividade e/ou expressão das proteínas regulatórias do trânsito de Ca^{2+} , otimizando o fluxo de Ca^{2+} intracelular e atenuando o prejuízo funcional cardíaco. **Objetivo:** Analisar a participação do trânsito de Ca^{2+} e suas proteínas reguladoras na melhoria da função cardíaca de ratos com EAo e disfunção ventricular pelo TF. **Material e Métodos:** Ratos *Wistar* machos (70-90 g), submetidos à cirurgia de EAo, foram divididos em dois grupos: controle operado (Sham) e EAo. Após 18 semanas da cirurgia, foi analisada função cardíaca para redistribuição dos grupos: não expostos ao TF (Sham, n= 36 e EAo, n= 29) e treinados (ShamTF, n= 33 e EAoTF, n= 32) durante 10 semanas. O treinamento físico aeróbio (TFa) em esteira foi realizado com velocidade equivalente ao limiar de lactato, obtida durante os testes de esforço (inicial, 4^a e 7^a semanas e final). A RC foi avaliada por ecocardiografia, músculo papilar e cardiomiócito isolados e macroscopia *post mortem*. O trânsito de cálcio miocárdico foi analisado pela elevação de cálcio extracelular, potenciação pós-pausa e bloqueios da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), pelo ácido ciclopiazônico, e dos canais de cálcio do tipo L, pelo diltiazem, no músculo papilar e pelo cardiomiócito. A expressão das proteínas envolvidas no trânsito de Ca^{2+} foi avaliada por Western Blot. Os resultados foram discutidos ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Na 18^a semana, antes do TFa, os animais EAo apresentavam hipertrofia ventricular esquerda concêntrica, disfunção diastólica e sistólica e intolerância ao exercício físico. O TFa atenuou a disfunção diastólica e beneficiou a função sistólica dos animais com sobrecarga pressórica.

Os animais EAoTF apresentaram melhor resposta à potenciação pós-pausa e ao bloqueio da SERCA2a que os EAo, o que sugere adequações positivas na recaptura de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Após inibição dos canais de cálcio tipo L houve diferença de resposta entre os grupos EAo e EAoTF, a qual também sugeriu melhor atividade da SERCA2a. Na análise do cardiomiócito, o TFa foi capaz de melhorar aspectos da função mecânica e a responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} dos animais cardiopatas. Os animais EAo apresentaram alteração na expressão proteica do Receptor de Rianodina, da SERCA2a e do NCX, sendo que o TFa restaurou os níveis da SERCA2a e do NCX próximos aos valores normais. **Conclusão:** Adequações positivas no trânsito de Ca^{2+} e suas proteínas reguladoras pelo TFa participam da atenuação da disfunção ventricular em ratos com estenose aórtica supravalvar.

Palavras-chave: estenose aórtica; treinamento físico aeróbio; hipertrofia fisiológica; função cardíaca; trânsito de cálcio.

ABSTRACT

Introduction: Several experimental models have been proposed for the study of cardiac remodeling (CR); among them, the induction of supravalvular aortic stenosis (AoS). The pathophysiological mechanisms responsible for the cardiac function depression include changes in calcium (Ca^{2+}) and its regulatory proteins. Exercise training (ET) has been used in the management of cardiopathies. In cardiac pathology due to pressure overload, ET completely or partially restores the activity and/or expression of regulatory proteins of Ca^{2+} handling, optimizing intracellular Ca^{2+} flow and attenuating cardiac functional impairment.

Objective: To analyze the participation of Ca^{2+} handling and its regulatory proteins in the improvement of the cardiac function of rats with aortic stenosis and ventricular dysfunction by ET. **Material and Methods:** Male Wistar rats (70-90 g) submitted to supravalvular aortic stenosis (AoS) were divided into two groups: operated control (Sham) and aortic stenosis (AoS). After 18 weeks of the surgical procedure, cardiac function analysis was performed for redistribution of the groups: non-exposed to exercise training (Sham, n = 36 and AoS, n = 29) and trained (ShamET, n = 33 and AoSET, n = 32) for 10 weeks. The treadmill exercise training was performed with a velocity equivalent to the lactate threshold, obtained during effort tests (initial, 4th and 7th weeks, and final). CR was evaluated by echocardiography, papillary muscle and cardiomyocyte isolated and *postmortem* macroscopy. The myocardial calcium handling was analyzed by the elevation of extracellular calcium, post-pause potentiation and Ca^{2+} pump blockade of the sarcoplasmic reticulum (SERCA2a), by cyclopiazonic acid, and L-type calcium channels by diltiazem in the papillary muscle and by the isolated cardiomyocyte. Expression of the proteins involved in Ca^{2+} handling was evaluated by Western Blot. The results were discussed at a significance level of 5%. **Results:** At the 18th week, before the ET, the AoS animals presented concentric left ventricular hypertrophy, diastolic and systolic dysfunction and intolerance to physical exercise. The ET attenuated the diastolic dysfunction

and benefited the systolic function of the animals with pressure overload. AoSET animals presented better response to post-pause potentiation and SERCA2a blockade than the AoS, suggesting a positive adaptation to the Ca^{2+} recapture by the sarcoplasmic reticulum. After inhibition of the L-type calcium channels there was a difference in response between the AoS and AoSET groups, which also suggested better SERCA2a activity. In the cardiomyocyte analysis, the ET was able to improve aspects of the mechanical function and the responsiveness of the myofilaments to the Ca^{2+} of the AoS animals. AoS animals presented alteration in the protein expression of the Rianodine Receptor, SERCA2a and NCX, and ET restored SERCA2a and NCX levels near normal values. **Conclusion:** Positive adaptations in the Ca^{2+} handling and its regulatory proteins by ET participate in the attenuation of ventricular dysfunction in rats with supraaortic stenosis.

Keywords: aortic stenosis; aerobic exercise training; physiological hypertrophy; cardiac function; calcium handling.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enfermidades com desfechos modificáveis pelo treinamento físico.....	22
Tabela 2. Benefícios do treinamento físico aeróbio (TFa) sobre o sistema cardiovascular.....	23
Tabela 3. Dados ecocardiográficos da 18ª semana.....	51
Tabela 4. Dados ecocardiográficos da 28ª semana... ..	53
Tabela 5. Contração isométrica basal.....	54
Tabela 6. Dados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca	67
Tabela 7. Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i>	68
Tabela 8. Teor de água nos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de lactato <i>versus</i> velocidade de corrida durante teste de esforço.....	31
Figura 2. Representação esquemática da curva de contração isométrica.....	37
Figura 3. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos.....	41
Figura 4. Representação esquemática dos parâmetros analisados pelo cardiomiócito isolado.....	42
Figura 5. Potenciação pós-pausa (PPP).....	56
Figura 6. Elevação de cálcio extracelular	58
Figura 7. Experimento Diltiazem.	60
Figura 8. Experimento Ácido Ciclopiazônico.....	62
Figura 9. Função mecânica dos cardiomiócitos.....	64
Figura 10. Trânsito de cálcio dos cardiomiócitos.....	65
Figura 11. Curvas representativas do cardiomiócito isolado.....	66
Figura 12. Frequência de sinais clínicos.....	67
Figura 13. Expressão das proteínas regulatórias do trânsito de Ca ²⁺	70
Figura 14. Avaliação do condicionamento físico.....	72

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Protocolo de treinamento físico.....	32
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1. Animais.....	26
2.2. Delineamento Experimental.....	26
2.3. Indução de estenose aórtica supravalvar.....	27
2.4. Teste de esforço máximo.....	27
2.5. Treinamento físico aeróbio.....	29
2.6. Remodelação cardíaca.....	30
2.6.1. Análise estrutural e funcional do coração <i>in vivo</i>	30
2.6.2. Análise da função miocárdica <i>in vitro</i>	32
2.6.2.1. Músculo papilar isolado.....	32
2.6.2.1.1. Parâmetros funcionais.....	34
2.6.2.1.2. Protocolo funcional.....	35
2.6.2.1.2.1. Potenciação pós-pausa.....	35
2.6.2.1.2.2. Elevação da concentração de cálcio extracelular.....	36
2.6.2.1.2.3. Bloqueio do canal tipo L sarcolemal.....	36
2.6.2.1.2.4. Bloqueio da SERCA2a.....	36
2.6.2.2. Cardiomiócito isolado.....	37
2.6.2.2.1. Isolamento.....	37
2.6.2.2.2. Função mecânica.....	38
2.6.2.2.3. Parâmetros funcionais.....	39
2.6.2.2.4. Análise do trânsito de cálcio intracelular.....	40
2.7. Análise das proteínas do trânsito de cálcio intracelular miocárdico.....	41
2.7.1. Técnica de Western Blot.....	41
2.7.1.1. Extração de proteínas.....	41
2.7.1.2. Eletroforese em gel.....	42
2.7.1.3. Transferência e identificação das proteínas.....	42
2.7.1.4. Quantificação de proteínas.....	44
2.8. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca.....	44
2.9. Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	45
2.10. Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	45
2.11. Análise estatística.....	45
3. RESULTADOS	48
3.1. Análise da estrutura e função cardíaca <i>in vivo</i>	48
3.2. Análise da estrutura e função cardíaca <i>in vitro</i>	52
3.2.1. Músculo papilar isolado.....	52
3.2.1.1. Condição basal.....	52
3.2.1.2. Potenciação pós-pausa.....	52
3.2.1.3. Elevação da concentração de cálcio extracelular.....	54
3.2.1.4. Experimento Diltiazem.....	56
3.2.1.5. Experimento Ácido Ciclopiazônico.....	58
3.2.2. Cardiomiócito isolado.....	60
3.3. Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca.....	65
3.4. Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	66
3.5. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	67
3.6. Expressão das proteínas do trânsito de cálcio miocárdico.....	67
3.7. Avaliação do condicionamento físico dos animais.....	68
4. DISCUSSÃO	72

5. CONCLUSÃO.....	87
6. REFERÊNCIAS.....	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca (RC) é um processo adaptativo que objetiva manter a homeostase fisiológica do coração em resposta a diferentes tipos de estímulos (1–5). Do nascimento à fase adulta, o processo de remodelação, desenvolvimento natural do coração, é proporcional ao crescimento do indivíduo (4–6); porém, o termo RC é, predominantemente, utilizado para descrever as respostas cardíacas a agressões nocivas, incluindo sobrecargas de volume e de pressão e isquemia miocárdica (6,7).

A adaptação cardíaca em curto prazo é benéfica; entretanto, a sustentação da agressão por longos períodos pode deprimir a capacidade adaptativa do coração, e acarretar a deterioração da função ventricular e ao quadro de insuficiência cardíaca (1,5,8–11). Isto ocorre em virtude dos eventos transcricionais, traducionais e pós-traducionais desencadeados no miocárdio, como resultado secundário à ativação de mecanismos autócrinos, parácrinos e neuroendócrinos compensatórios (4,10,11).

Estudos experimentais têm avaliado a RC nos seguintes modelos de sobrecarga pressórica: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (12) e estenose das artérias renal (13), abdominal (14–16) ou torácica (17–23). Entre os exemplos citados, a estenose aórtica supraavalvar (EAo) tem sido utilizada por promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos jovens (17–25); a sobrecarga pressórica acentua-se progressivamente à medida que os animais sofrem o processo de crescimento.

Em nosso laboratório, têm sido desenvolvidos experimentos com EAo em ratos, a fim de avaliar aspectos moleculares, celulares, metabólicos, estruturais e funcionais da RC durante o processo evolutivo, da agressão à insuficiência cardíaca (IC), pontuando inclusive o momento em que os sinais clínicos desta síndrome são constatados (17,19–23,26,27). Esses estudos mostraram, entre outros, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica na 6^o semana e

deterioração do desempenho sistólico e aparecimento de sinais de IC nas semanas subsequentes (21-23,26-33).

Como citado anteriormente, após agressão, de forma aguda, os mecanismos de reserva adequam o estresse parietal e mantêm o equilíbrio funcional do coração. Entretanto, quando esta ativação compensatória é acentuada e persistente, ocorre perda da harmonia molecular e celular do miocárdio e alteração da geometria ventricular, culminando em deterioração da capacidade adaptativa cardíaca (3,5,10,11). Os seguintes desajustes têm sido apontados como envolvidos no processo de **transição** da RC *adaptativa* à *maladaptativa*: 1) **em nível de cardiomiócito**, alteração nas proteínas contráteis, no citoesqueleto e no metabolismo energético, reprogramação fetal, diminuição da responsividade adrenérgica e prejuízos no acoplamento excitação/contração/relaxamento; 2) **em nível miocárdico**, acentuada perda de miócitos por necrose, apoptose ou autofagia, e alterações na matriz extracelular; e 3) **na câmara ventricular esquerda**, dilatação, aumento da esfericidade, afinamento da parede e insuficiência da válvula mitral (5,11). O prejuízo da resposta angiogênica, a acentuação das ativações dos sistemas adrenérgico e renina-angiotensina-aldosterona e da liberação de mediadores inflamatórios, o estresse oxidativo e a desregulação da expressão gênica miocárdica via microRNA's são considerados os indutores cruciais a estas adaptações negativas (3,4,10,11).

Este trabalho tem como foco principal a avaliação do acoplamento excitação/contração/relaxamento, especificamente, do trânsito de cálcio (Ca^{2+}) dos cardiomiócitos e seus elementos regulatórios na terapêutica da remodelação patológica. O trânsito de Ca^{2+} intracelular é um dos principais mecanismos reguladores da contração e relaxamento miocárdico (34,35). Em nível celular, o processo de contração cardíaca inicia-se com a despolarização do sarcolema pelo potencial de ação, o que acarreta abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L com conseqüente influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior da célula (35,36). O influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de grande quantidade deste íon pelos receptores

de rianodina (RyR) do retículo sarcoplasmático (RS) para o citosol, mecanismo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (36,37). O aumento de Ca^{2+} citosólico viabiliza sua ligação à troponina C (TnC) e, conseqüentemente, a interação entre actina e miosina. A intensidade da contração depende, entre outros fatores, da quantidade e sensibilidade dos miofilamentos de TnC ao Ca^{2+} . Após o evento excitação-contração, inicia-se o relaxamento miocárdico devido à redução da concentração de Ca^{2+} citosólico. A remoção dos íons Ca^{2+} para o interior do RS e a extrusão para o meio extracelular são essenciais para o relaxamento. O processo de recaptura de Ca^{2+} para o interior do RS, onde é depositado na calsequestrina (CSQ), é realizado pela Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), cuja atividade é regulada pela fosfolambam (PLB); a fosforilação desta proteína permite a captura do Ca^{2+} pela SERCA2a (35). Outras proteínas do sarcolema, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e a bomba de Ca^{2+} ATPásica, e a mitocôndria também atuam como reguladores da remoção de Ca^{2+} do miocárdio (36,38).

Pesquisadores referem, em modelos experimentais de disfunção ventricular e/ou insuficiência cardíaca, alterações na expressão e/ou função das proteínas intracelulares e transmembranas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} ; assim, modificações nas proteínas, canal L, PLB, SERCA2a, NCX, CSQ e RyR, acarretam prejuízo na homeostase do Ca^{2+} miocárdico, sendo implicadas em uma variedade de doenças cardiovasculares (36,39–61). Especificamente, na remodelação em resposta à estenose aórtica, estudo anterior do nosso grupo mostrou que após 6 semanas de cirurgia de indução à doença há prejuízo na atividade da SERCA2a (49). Além disso, outros autores ratificaram, por diferentes métodos e períodos de EAo, alterações qualitativas (40,61,62) e quantitativas (48,50) das proteínas do RS e degradação e diminuição da atividade e expressão dos canais do tipo L (52) como fundamentais para a deterioração do desempenho cardiomiocitário neste modelo experimental. Adicionalmente, estudos mostram

que há ineficiência do mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (53) e prejuízo global no trânsito de Ca^{2+} na estenose aórtica (48,53).

Terapêuticas farmacológicas (57,63–66) e não farmacológicas (29–32,48,67–70) têm sido empregadas para promover atenuação da disfunção e/ou adiamento da falência ventricular em indivíduos com remodelação cardíaca. Dentre as intervenções não farmacológicas atualmente adotadas, destaca-se a prática regular de exercício físico (29–32,48,68–70).

O treinamento físico (TF) é um tipo de atividade física programada, sistematizada e cotidiana que tem como objetivo o aprimoramento do condicionamento corporal (71–73). A importância do TF no mundo contemporâneo é evidenciada pelo seu papel: 1) na melhoria da aptidão física dos praticantes, essencial para otimizar a realização de atividades cotidianas (73,74); 2) na prevenção de doenças, tornando improvável que o indivíduo ativo na juventude desenvolva fatores de risco a doenças crônicas; 3) na atenuação dos efeitos de possíveis enfermidades relacionadas ao envelhecimento (73,75–78); e 4) por amenizar consequências de doenças vigentes (Tabela 1) (71,73,76,77,79–81). Com base nessas prerrogativas, o TF é considerado fundamental na melhoria da qualidade de vida, na longevidade e na diminuição da taxa de morbidade e mortalidade populacional (72,73,77–83).

Tabela 1. Enfermidades com desfechos modificáveis pelo treinamento físico.

Obesidade
Aterosclerose
Diabetes mellitus
Osteoartrite
Osteoporose
Doenças reumáticas
Depressão
Doença de Parkinson
Doença de Alzheimer
Outras desordens mentais
Câncer
Hipertensão arterial sistêmica
Insuficiência cardíaca

O comportamento do organismo frente a dois tipos de treinamento, o **resistido**, realizado com pouco ou nenhum movimento (82) e designado para aumento de força e resistência muscular (ex: musculação), e o **aeróbio ou de *endurance*** (TFa), dinâmico, repetitivo e de longa duração, com a utilização de vários músculos simultaneamente (ex: ciclismo, natação e corrida), têm sido investigados na literatura (71).

Estudos em seres humanos e animais de experimentação saudáveis, isto é, isentos de doenças, verificaram as repercussões adaptativas benéficas proporcionadas pelo TFa em vários sistemas, incluindo o cardiovascular. Neste aparato, especificamente, as adequações podem ocorrer em níveis estrutural e funcional, incluindo, entre outras, as seguintes manifestações: hipertrofia cardíaca fisiológica, aumento das capacidades de ejeção e enchimento ventricular, diminuição da frequência cardíaca de repouso e da resistência vascular periférica e elevação do retorno venoso (Tabela 2) (4,84–89).

Tabela 2. Benefícios do treinamento físico aeróbio (TFa) sobre o sistema cardiovascular.

Adaptações	Treinamento físico aeróbio
Vascular	
Resistência vascular periférica	↓↓
Pressão arterial pós-exercício	↓↓
Pressão arterial sistólica / diastólica de repouso	↔↓
Rigidez aórtica	↓↓
Complacência aórtica	↑↑
Complacência venosa	↑↑
Retorno venoso	↑↑
Cardíaca	
Capacidade contrátil do VE	↑↑
Capacidade de enchimento diastólico do VE	↑↑
Débito cardíaco de repouso	↑↑
Débito sistólico de repouso	↑↑
Frequência cardíaca de repouso	↓↓
Resposta taquicárdica durante a sessão de TF	↓↓
Relação onda E/A	↔↑
Hipertrofia fisiológica do VE	↑↑
Hipertrofia patológica do VE	↓↓
Proliferação de cardiomiócitos	↔↔↔
Capilarização	↑↑

↓↓- valores diminuídos; ↑↓- efeitos médios; ↔↑, ↔↓- sem efeitos ou mudança leve; ↔↔↔- pouco estudado. VE- ventrículo esquerdo; E/A- enchimento inicial/enchimento final. Adaptado de Egan *et al* (74).

Os mecanismos envolvidos nas alterações de estrutura e função do sistema cardiovascular normal pelo TFa não estão totalmente esclarecidos. Neste contexto, as seguintes adaptações têm sido observadas em indivíduos sadios treinados: 1) em nível vascular, destacam-se angiogênese (5), melhoria da função endotelial por aumento da atividade da óxido nítrico sintase, diminuição do estresse oxidativo (90–92) e desativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona (93); 2) no coração, ativação de vias de sinalização que asseguram a hipertrofia fisiológica (insulina, fator de crescimento semelhante à insulina [IGF-1], hormônio tireoidiano [T3], óxido nítrico, fator de crescimento do endotélio vascular [VEGF],

neurorregulina 1, integrinas e microRNA's) (4,5,94,95), diminuição da deposição de colágeno (4,94,96), atenuação da modulação simpática (4,87–89,94), elevação dos níveis de angiotensina 1-7 e diminuição da angiotensina II (82,86,93,94,96), aumento do número e melhoria do conteúdo e da capacidade oxidativa das mitocôndrias (86,94,97), proteção antioxidante (86,93,94,98), defesa contra os processos de necrose e apoptose (94,98,99) e melhoria do trânsito de Ca^{2+} intracelular (4,86,94,100–107).

Investigações prévias relacionando TFa, coração normal e trânsito de Ca^{2+} fornecem resultados contraditórios. Alguns estudos mostraram que, em cardiomiócitos isolados, há melhoria do inotropismo devido, entre outros fatores, a elevação do fluxo de Ca^{2+} consequente ao aumento da expressão gênica e a melhoria da atividade das proteínas regulatórias, e da maior sensibilidade da troponina C ao íon Ca^{2+} (101,103–108); entretanto, na literatura existe um corpo de evidências que não confirma a influência do TFa nos sistemas regulatórios do Ca^{2+} miocárdico, em ratos não cardiopatas (109,110).

Nas doenças cardíacas, dado o seu potencial terapêutico e preventivo, o TFa tem sido proposto como ferramenta não farmacológica com a finalidade de melhorar e/ou recuperar a capacidade funcional do coração (48,86,94,111–116). Entre os fatores responsáveis pelo benefício referido está a melhoria do trânsito de Ca^{2+} intracelular (48,70,94,100,116–123)

Em modelos de infarto do miocárdio em ratos (100,120,121,123), de hiperatividade simpática genética em camundongos (70,122) e de sobrecarga de frequência cardíaca por marcapasso ventricular em cães (117), o TFa preveniu o desenvolvimento de falência cardíaca; este fenômeno foi resultado, entre outros, do aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (123), da melhoria da capacidade de remoção do Ca^{2+} diastólico (120,121) e da normalização da expressão gênica das proteínas regulatórias do trânsito de Ca^{2+} (70,100,117,122). Ratos transgênicos com aumento da atividade da proteína kinase 2-dependente de Ca^{2+} /calmodulina citosólica (CaMKII δ c), submetidos a treinamento físico,

apresentaram melhoria da função cardíaca *in vivo* e nos cardiomiócitos isolados (118). Estas adaptações foram relacionadas aos aumentos do influxo sarcolemal do Ca^{2+} pelos canais L, da amplitude do trânsito e do Ca^{2+} diastólico; além disso, houve diminuição dos *sparks* de Ca^{2+} e ajustes nos processos de recaptura do Ca^{2+} pela SERCA2a do retículo sarcoplasmático e de extrusão celular do Ca^{2+} pelo NCX (118). Em consonância, o TFa promoveu respostas benéficas similares em animais com sobrecarga pressórica por hipertensão arterial sistêmica (116,119). Assim, Garcarena *et al* (116), em ratos SHR, verificaram melhoria do desempenho do coração, provavelmente devido ao *upregulation* da SERCA2a. Carneiro-Júnior *et al* (119), utilizando o mesmo modelo experimental, constataram diminuição das liberações espontâneas de Ca^{+2} (*sparks*), e normalização da expressão gênica da RyR e da sua proteína estabilizadora, a proteína de ligação FK506 (FKBP12.6) ou calstabilina 2.

A literatura apresenta carência de estudos que avaliaram a participação do trânsito de Ca^{+2} e suas proteínas regulatórias na melhoria da função cardíaca de animais com EAo pelo treinamento físico aeróbio (48,50). Na disfunção cardíaca consequente a diferentes modelos de estenose aórtica experimental, há divergência dos resultados após intervenção com treinamento físico (48,50). Em porcos cardiopatas com EAo e fração de ejeção preservada, o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade melhorou as características funcionais do cardiomiócito isolado, sendo esta adequação positiva relacionada com a atenuação dos prejuízos homeostáticos do trânsito de Ca^{2+} (48); os autores observaram aumento da relação SERCA2a/PLB, da PLB fosforilada na serina 16 e do NCX, além da diminuição do Ca^{2+} diastólico. Em contrapartida, van Deel *et al* (50), em camundongos com estenose aórtica severa, verificaram que o exercício voluntário, incorporado imediatamente após a cirurgia, não restaurou os níveis de SERCA2a e de RyR.

Em nosso laboratório, investigadores analisaram o desempenho ventricular em ratos com estenose aórtica supra-avalvar submetidos a 10 semanas de TFa, durante o processo de

transição da disfunção à insuficiência cardíaca. Nestes estudos, foi observado que o treinamento melhorou as funções sistólica (28–32) e/ou diastólica (29–33) do ventrículo esquerdo, avaliadas por ecocardiografia. Além disso, os animais treinados apresentaram redução da frequência e intensidade dos sinais clínicos de insuficiência cardíaca, em relação aos animais não treinados.

Em razão dessas investigações (28–33) não terem analisado os mecanismos responsáveis pela melhoria da função cardíaca, e dos resultados conflitantes na literatura em relação às adaptações da dinâmica de Ca^{2+} miocárdico (48,50), este trabalho teve como objetivo analisar a participação do trânsito de Ca^{2+} e suas proteínas reguladoras na melhoria da função cardíaca de ratos com EAo e disfunção ventricular. A hipótese desta investigação é que as adequações positivas no trânsito de Ca^{+2} intracelular, conseqüente à restauração da atividade e expressão de suas proteínas regulatórias, têm participação fundamental na melhoria da função cardíaca de ratos EAo submetidos a TFa. A importância do trabalho foi identificar se o restabelecimento do trânsito de Ca^{+2} está entre os mecanismos envolvidos na melhoria do desempenho cardíaco dos animais cardiopatas, e reforçar que o treinamento físico, uma terapêutica de baixo custo, fácil implementação e execução, pode colaborar na manutenção da sobrevivência de pacientes com cardiopatias graves, até o estabelecimento de uma terapêutica definitiva.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada; temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. A oferta de água e ração foi *ad libitum* e, o peso corporal foi aferido semanalmente. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo U.S. National Institutes of Health” e submetido à aprovação pela “Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP”.

2.2 Delineamento experimental

Foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham; n= 69) e estenose aórtica supravalvar (EAo; n= 61). Após 18 semanas do procedimento cirúrgico, período em que os animais com EAo desenvolvem disfunção do VE, os ratos Sham e EAo foram submetidos a ecocardiograma e redistribuídos de forma randomizada em dois subgrupos, quanto a presença ou ausência de treinamento físico, por período de 10 semanas. Dentro deste contexto, na segunda etapa, o experimento foi composto por quatro grupos experimentais: controle operado (Sham, n = 36); controle operado e treinamento físico (ShamTF, n = 33); estenose aórtica supravalvar (EAo, n = 29); e estenose aórtica supravalvar e treinamento físico (EAoTF, n = 32). O delineamento experimental, deste estudo, foi proposto em virtude de trabalhos anteriores terem evidenciado influência benéfica do treinamento físico sobre a função cardíaca de ratos

com EAo e disfunção ventricular (29,31,32). Entretanto, os autores não investigaram os mecanismos relacionados a esses benefícios.

2.3 Indução de estenose aórtica supravalvar

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (17–23). Os animais com três a quatro semanas de vida, pesando de 70 a 90 gramas, após anestesia com cloridrato de ketamina (60 mg/kg; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda-Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda- Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) intramuscular, foram submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,62 mm de diâmetro interno, foi colocado aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada utilizando-se fio *mononylon* 5.0 para suturar o esterno, as camadas musculares e a pele. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com pressão positiva com oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos receberam no subcutâneo 1 ml de soro fisiológico aquecido e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, exceto pela colocação do clipe.

2.4 Teste de esforço máximo (TE)

A prescrição do treinamento físico e a avaliação do condicionamento físico foram realizadas pelo TE. Após 1 semana de adaptação à esteira, os grupos Sham, ShamTF, EAo e EAoTF foram submetidos ao TE em esteira rolante. Antes do início do TFa foi realizado o TE que teve como intuito prescrever a carga inicial de trabalho. Após a 4^a e a 7^a semana de TFa foram realizados novos TE com a finalidade de reajustar as cargas de trabalho. Ao final da 10^a semana de TFa foi novamente realizado TE para avaliar o nível de condicionamento físico final dos animais.

O teste de esforço foi iniciado à velocidade de 6 m/min, sendo progressivamente aumentada (3 m/min) a cada 3 minutos, até a exaustão, conforme descrito anteriormente (124). O término do teste foi definido pela exaustão do animal; o critério de exaustão adotado foi a não manutenção da corrida, na velocidade imposta, durante 5 segundos. Durante os testes, no momento basal e após cada incremento de velocidade foi realizada coleta de 25 μ l de sangue da cauda do animal para análise das concentrações de lactato. Para a coleta foram utilizadas lâminas de vidro, 25x75x1 mm, (*Sigma Chemical Company*®- USA, modelo *Techware S8902*), micropipetas, 20 a 200 μ l, (*Nichiryo Co.*®- Japão, Modelo *Nichipet NPX 200*) e ponteiros descartáveis. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos, do tipo *Eppendorf* de 0,5 ml, contendo 50 μ l de fluoreto de sódio a 1% e mantidas em freezer até o período de análise. A concentração de lactato foi determinada pelo método eletro-enzimático com o uso de lactímetro, marca *Yellow Springs Instruments*®, *2300 Stat Plus Glucose & L-Lactate Analyzer*- USA.

Adaptado de Souza *et al*(31), a prescrição do TFa foi baseada na análise das curvas de lactato, sendo prescrita a velocidade equivalente ao limiar de lactato (V_{LL}). A determinação deste ponto foi feita por meio da plotagem gráfica das concentrações de lactato *versus* a velocidade de corrida dos estágios. O momento em que ocorreu quebra da linearidade da curva em função do aumento da velocidade, estabelecido por inspeção visual, foi considerado o limiar de lactato. A Figura 1 mostra os resultados do teste de esforço de dois animais do estudo.

A análise do lactato sanguíneo permite avaliar com acurácia a capacidade aeróbia e o condicionamento físico do animal durante e após o período de treinamento (125,126). As variáveis analisadas para determinar o condicionamento físico dos animais foram: as velocidades de exaustão (V_{EX}) e do limiar (V_{LL}), a distância percorrida (DP), o tempo total de teste (TTT), as concentrações de lactato, em milimoles por litro (mmol/L), basal ($[LAC]_B$), no limiar ($[LAC]_{LL}$), no pós-limiar ($[LAC]_{PL}$) e na exaustão ($[LAC]_{EX}$) e suas correções pela velocidade de corrida nos respectivos pontos, L_{LL}/V_{LL} , L_{PL}/V_{PL} e L_{EX}/V_{EX} .

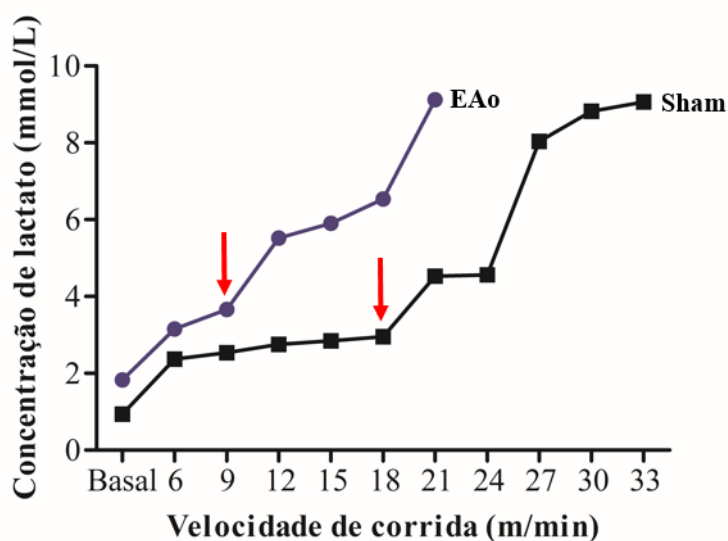


Figura 1. Concentração de lactato *versus* velocidade de corrida durante teste de esforço incremental. Setas vermelhas indicam o ponto de inflexão da curva, determinado como limiar de lactato. EAO: estenose aórtica supralvar; Sham: controle operado.

2.5 Treinamento físico aeróbio

O protocolo de TFa, adaptado de Souza *et al*(31), foi iniciado 18 semanas após a cirurgia e envolveu um programa de corrida em esteira rolante específica para ratos (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), com frequência de cinco vezes por semana, perfazendo 10 semanas consecutivas (29,31,32). Os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira rolante, o qual consistiu em caminhada de baixa intensidade, velocidade de 5 m/min, com a finalidade de minimizar o estresse ao ambiente antes do início do protocolo de TFa. O programa de TFa está ilustrado no Quadro 1. A velocidade equivalente ao limiar de lactato, obtida em teste de esforço incremental, foi determinada como a intensidade de treinamento. O volume diário aumentou progressivamente durante o treinamento, apresentando as seguintes características: 10, 12, 14 e 16 minutos de duração nas semanas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e 16, 18 e 20 minutos de duração nas semanas 5, 6 e 7, respectivamente. O volume de treinamento foi mantido em 20 minutos até o final do protocolo.

Quadro 1. Protocolo de treinamento físico aeróbio.

Momentos	Progressão do treinamento	
	Volume (min)	Intensidade
Adaptação		
Teste de esforço inicial		
1ª semana	10	V _{LL}
2ª semana	12	V _{LL}
3ª semana	14	V _{LL}
4ª semana	16	V _{LL}
2º teste de esforço		
5ª semana	16	V _{LL}
6ª semana	18	V _{LL}
7ª semana	20	V _{LL}
3º teste de esforço		
8ª semana	20	V _{LL}
9ª semana	20	V _{LL}
10ª semana	20	V _{LL}
Teste de esforço final		

V_{LL}: velocidade equivalente ao limiar de lactato obtido durante teste de esforço incremental.

2.6 Remodelação cardíaca

2.6.1 Análise estrutural e funcional do coração *in vivo*

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada *in vivo* por meio do ecocardiograma. A análise ecocardiográfica foi realizada após 18 e 28 semanas de indução de EAo. O estudo após 18 semanas teve como finalidade caracterizar, estrutural e funcionalmente, os ratos Sham e EAo, a fim de formar grupos homogêneos com EAo (EAo e EAoTF) e Sham (Sham e ShamTF). A análise após 28 semanas avaliou a influência do treinamento físico por 10 semanas. O ecocardiograma representa uma alternativa para o estudo da função ventricular e pode oferecer importantes informações sobre desempenho cardíaco em roedores (127). Ele permite avaliar: 1) a morfologia e a função do coração (22–24); 2) a evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão (128) e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração (21). É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriais (129). É um processo que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que

técnicas invasivas, como a hemodinâmica (130). É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício (131).

Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda- Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda- Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo-M com o feixe de ultra-som, orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares (24). As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) foi medido no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar a função sistólica do VE, foram calculadas a porcentagem de encurtamento mesocárdico, ΔD meso $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + EDSIV)\}$, e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior, e fração de ejeção $(DDVE^3 - DSVE^3 / DDVE^3)$. Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente à ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras; a medida dos fluxos foi realizada no monitor do ecocardiógrafo (132), sendo avaliados os picos das velocidades do

fluxo transvalvar mitral correspondentes à fase de enchimento inicial (onda E) e à fase de enchimento tardio, conseqüente à contração atrial (onda A), assim como a relação E/A. Em adição, foram calculadas as ondas E' e A', velocidades de deformação do tecido adjacente ao anel mitral na fase de enchimento inicial e após a contração atrial, respectivamente, e as relações E'/A' e E/E'. Foram também mensurados os tempos de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e de decaimento da onda E (TDE).

2.6.2 Análise da função miocárdica *in vitro*

A função do miocárdio foi analisada *in vitro* por meio da técnica de músculo papilar isolado.

2.6.2.1 Músculo papilar isolado

A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo, realizada rotineiramente em nosso laboratório (133,134), avalia a função mecânica do miocárdio *in vitro*. Esta preparação permite detectar alterações na contração e no relaxamento do músculo cardíaco, independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, o que é difícil de ser obtido na avaliação do coração *in vivo*.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), submetidos à eutanásia por decapitação e, posteriormente, à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit de acordo com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 24,88 NaHCO₃, previamente aerados durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) e mantidos à temperatura de 28°C. Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os corações

foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular; este foi dividido a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar a lesão da extremidade dos músculos papilares. Estes, após terem suas extremidades presas aos anéis, foram rapidamente transferidos para um sistema de banho de tecido isolado (PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha) contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida à temperatura de 28°C, usando-se um termorregulador acoplado ao sistema (PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (MLT0201 Force Transducer, ADInstruments do Brasil, São Paulo, Brasil). O fio de aço atravessa uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que está ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Sobre esta extremidade existe um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. nº 463, USA) que controla a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha, posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a um estimulador elétrico (LE12406 - Estimulador, PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha) que emite estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizada foi de 12 a 15 volts, aproximadamente, 10%

acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução foi entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 a 600 mmHg.

Após um período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraíram contra uma pré-carga (5g), contração isotônica, foi colocado uma carga adicional de 50 g, denominada *pós-carga*, no transdutor de força. A carga total, pré-carga acrescida da pós-carga, impede que os músculos encurtem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impede a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se L_{max} . Após atingir o L_{max} , o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para determinação final de L_{max} . O registro das variáveis foi iniciado após verificar que o músculo permanece estável em contração isométrica durante 15 minutos.

2.6.2.1.1 Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados de uma curva obtida em contração isométrica: tensão desenvolvida máxima (TD , g/mm^2), tensão de repouso (TR , g/mm^2), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$). A curva de contração isométrica que foi obtida durante os experimentos está representada abaixo, na Figura 2.

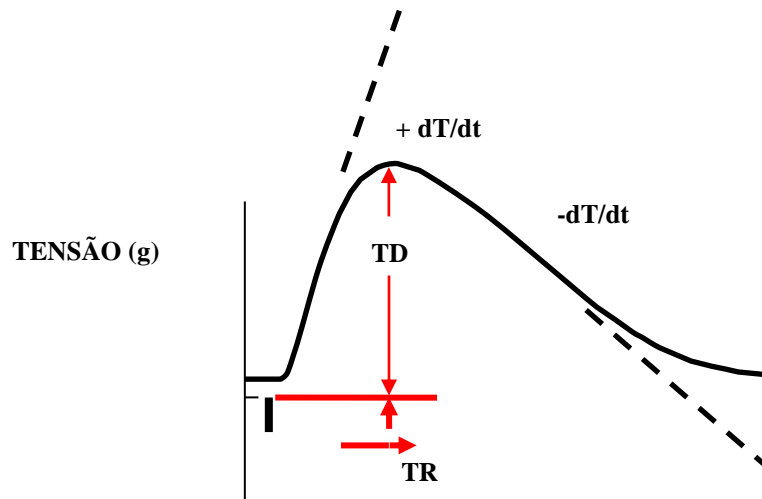


Figura 2. Representação esquemática da curva de contração isométrica.

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, ADInstruments do Brasil, São Paulo, Brasil). A análise das curvas permite determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permite comparar o desempenho de músculos de áreas seccionais diferentes. Os dados obtidos foram apresentados em valores relativos (g/mm^2).

2.6.2.1.2 Protocolo funcional

Para determinar os mecanismos pelos quais a EAO acarreta disfunção miocárdica, os músculos papilares, em contração isométrica, foram avaliados em condição basal (concentração de $Ca^{+2} = 2,5$ mM) e após diferentes manobras inotrópicas e lusitrópicas. Essas intervenções têm a finalidade de identificar alterações da contração e do relaxamento que podem não ser observadas em condições basais. As seguintes manobras foram realizadas:

2.6.2.1.2.1 Potenciação pós-pausa

A potenciação pós-pausa (PPP) é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Esta manobra permite analisar o relaxamento miocárdico e, indiretamente, o trocador Na^+/Ca^{2+} (135–137). A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de cálcio de 0,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30 e 60 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada elevação. Os períodos crescentes tiveram a finalidade de disponibilizar

maiores quantidades de cálcio citosólico e, portanto, intensificar a magnitude do desempenho do músculo cardíaco.

2.6.2.1.2.2 Elevação da concentração de cálcio extracelular

A elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular acarreta aumento do influxo desse íon por meio dos canais lentos de Ca^{2+} e pela troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o que permite, também como o PPP, avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de Ca^{2+} intracelular e a função miocárdica (138). A elevação da concentração de Ca^{2+} na solução de Krebs-Henseleit foi realizada com aumentos sequenciais de Ca^{2+} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada concentração.

2.6.2.1.2.3 Bloqueio do canal tipo L sarcolemal

Após o protocolo inicial foi realizada análise da atividade do canal de cálcio tipo L, utilizando inibidor específico denominado diltiazem. O diltiazem (Diltiazem Hydrochloride, Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) é um bloqueador específico dos canais lentos sarcolemais da classe das benzotiazepinas (139,140). Os canais L no coração contêm subunidades α_{1C} que são altamente sensíveis ao diltiazem, o que resulta em diminuição da entrada de cálcio miocárdico. Neste experimento, os cardiomiócitos foram avaliados a partir de elevação sequencial de Ca^{2+} de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM na presença ou ausência do bloqueador. A dose de diltiazem diluída em água ultrapura foi de 10^{-5}M .

2.6.2.1.2.4 Bloqueio da SERCA2a

A análise da atividade da SERCA2a foi realizada utilizando bloqueador específico denominado ácido ciclopiazônico (*Penicillium cyclopium*, Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) na solução nutriente na dose 30 μM . (141,142). Neste experimento, os músculos

papilares foram avaliados a partir de elevação sequencial de Ca^{2+} de 0,5 para 1,5 e 2,5 mM na presença ou ausência do bloqueador.

As ações dos bloqueadores, *diltiazem* e *ácido ciclopiazônico*, sobre a função mecânica do músculo papilar foram analisadas da seguinte forma: porcentagem (%) média de bloqueio foi calculado pela seguinte fórmula: $\Delta(\%) = (M2-M1)/M1 \times 100$, onde M1 é o valor da variável na concentração de cálcio extracelular na ausência do bloqueador e o M2 é o valor da mesma variável em resposta aos bloqueadores.

2.6.2.2 Cardiomiócito isolado

As análises estrutural, funcional e do trânsito de Ca^{2+} intracelular foram realizadas por meio da técnica do cardiomiócito isolado, a qual avalia a função cardiomiocitária sem a influência da matriz extracelular. A avaliação ocorreu após 28 semanas de cirurgia, ou seja, ao fim da 10ª semana de TFa.

2.6.2.2.1 Isolamento

A análise do cardiomiócito isolado foi realizada conforme técnica descrita realizada por Guatimosim *et al*(143). Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e submetidos à eutanásia e à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e transferidos para uma placa de petri contendo solução Digestion Buffer (DB) + ácido etileno glicol tetracético (EGTA - *ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid*) + N-2-hidroxietyl piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES). A solução DB consistia de solução básica com água ultrapura (milli-Q) e a seguinte composição (mM): NaCl (130); MgCl_2 (1.4); KCl

(5,4); N-2-hidroxietil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES) (25); glicose (22); NaH_2PO_4 (0,33); pH = 7,39. A artéria aorta foi canulada utilizando-se a técnica de Langendorff e o coração perfundido com solução de DB+HEPES+EGTA em fluxo constante para limpeza dos vasos coronários por um período de 2 a 3 minutos. Após a canulação e limpeza, o coração foi perfundido com solução enzimática contendo solução DB, collagenase (21 mg) e Ca^{2+} (1 mM) por 12 a 15 minutos. As soluções utilizadas neste processo foram continuamente aeradas com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantidas em banho maria a $37,5^\circ\text{C}$.

Após a perfusão, os átrios foram retirados e o coração foi cortado em uma placa de petri contendo solução DB + albumina + collagenase + Ca^{2+} (1mM). Os fragmentos do coração (*pellet*) foram ressuspensos levemente em um becker com pipeta pasteur por 2 minutos em banho maria a $37,5^\circ\text{C}$. Em seguida, as células foram dissociadas, ressuspensas e filtradas. Após 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado a cada 10 minutos, com soluções de DB + albumina + Ca^{2+} . A cada etapa os tubos contendo as células e as soluções foram mantidos em repouso por aproximadamente 10 minutos e o sobrenadante descartado. Nessa etapa, foi adicionado ao *pellet* solução Tyrode com a seguinte composição (mM): NaCl (140); HEPES (10); NaH_2PO_4 (0,33); MgCl_2 (1); KCl (5); CaCl_2 (1,8) e Glicose (10). As soluções utilizadas neste processo foram aquecidas previamente a $37,5^\circ\text{C}$.

2.6.2.2 Função mecânica

A função mecânica celular foi mensurada por meio da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, conforme descrito previamente (143). As mensurações de contração-relaxamento celular utilizaram um sistema de detecção de bordas acoplado ao microscópio invertido (IonOptix, Milton, MA, USA) com lente objetiva de 40 vezes (Nikon Eclipse - TS100, EUA). Os cardiomiócitos foram acomodados em câmara experimental com base de vidro, banhados por solução Tyrode temperatura de $37,5^\circ$ e visualizados em um monitor

por meio de uma câmera (Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA, 240 Hz) acoplada ao microscópio com um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix).

Os cardiomiócitos foram estimulados em frequência de 1 Hz com duração de 5 milisegundos e voltagem de 20 V, utilizando-se um par de eletrodos de aço e um estimulador elétrico de campo (Myopacer, IonOptix, Milton, MA, USA). Os movimentos das bordas dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ion Optix, Milton, MA, USA) e armazenados para análise posterior. As medidas de contração foram realizadas em cardiomiócitos isolados que apresentaram as seguintes condições: bordas e estriações sarcoméricas bem definidas (Figura 3), relaxados em repouso e sem apresentar contrações voluntárias.

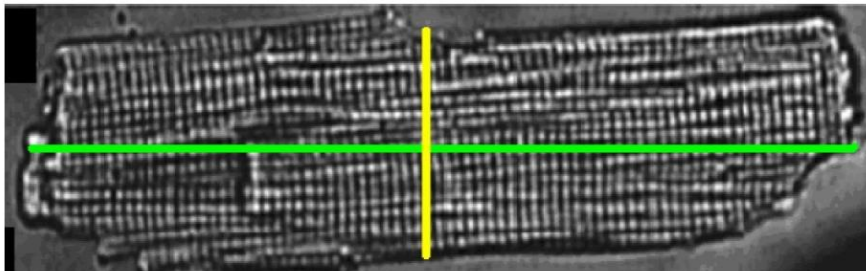


Figura 3. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos.

2.6.2.2.3 Parâmetros funcionais

As propriedades contráteis dos cardiomiócitos foram avaliadas utilizando um sistema de aquisição do espaçamento do sarcômero baseado por vídeo (*video-based sarcomere spacing; SarcLen, IonOptix, Milton, MA*). Miócitos quiescentes com a disposição clara das estriações foram escolhidos para as análises contráteis. As células foram colocadas em uma câmara de cultura com sistema próprio de estimulação acoplado ao microscópio invertido (*Nikon TE2000U, Nikon, Melville, NY, EUA*), sendo eletricamente estimuladas e perfundidas com solução tampão HEPES a temperatura ambiente. As alterações no comprimento dos sarcômeros foram registradas e posteriormente analisadas utilizando software específico (*Ion Wizard,*

IonOptix, Milton, MA, EUA). Foram avaliados o comprimento dos sarcômeros e os seguintes parâmetros contráteis: fração de encurtamento (FEnc), velocidades máximas de encurtamento (VME) e relaxamento (VMR), tempos até 50% do pico de encurtamento ($T_{ENC50\%}$) e de relaxamento ($T_{REL50\%}$) (Figura 4).

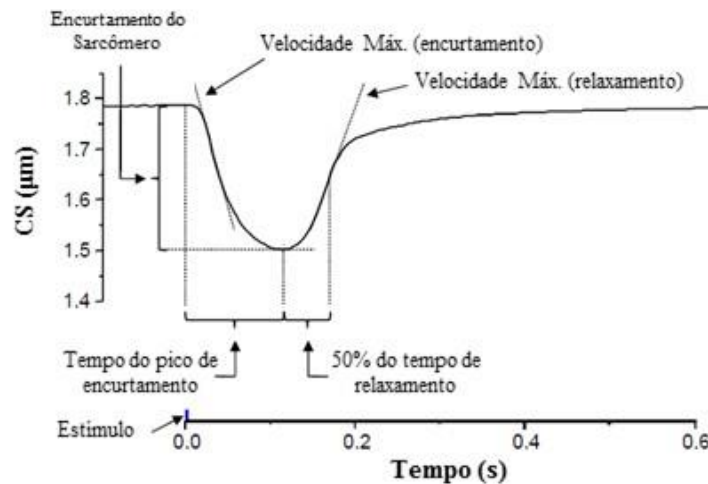


Figura 4. Representação esquemática dos parâmetros analisados pela técnica do cardiomiócito isolado. CS: comprimento do sarcômero.

2.6.2.2.4 Análise do trânsito de Ca^{2+} intracelular

Os cardiomiócitos foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Para avaliação do trânsito de Ca^{2+} as células foram carregadas com 1 μM Fura-2 AM por 20 min, em temperatura ambiente, e lavadas com solução extracelular de Tyrode para retirar o excesso de sangue (144). Antes da aquisição da imagem, os miócitos foram estimulados a 1 Hz (Myopacer 100, Ionoptix Inc.) com as seguintes configurações: duração de 2 ms; estimulação contínua pulso bifásico; voltagem ajustada a 120% da tensão de limiar que induz os transientes de Ca^{2+} . As imagens de fluorescência foram obtidas usando excitação de 340 nm a 380 nm e emissão de intensidade de fluorescência detectada em aproximadamente 510 nm. A avaliação da sensibilidade dos cardiomiócitos ao cálcio foi averiguada pelas relações do cálcio sistólico com a fração (CS/FEnc) e a velocidade máxima

de encurtamento (CS/VME). Além disso, foram analisados os tempos para atingir o pico (TAPC) e 50% do pico (TAPC_{50%}) e do decaimento (TADC_{50%}) do Ca²⁺ citosólico.

2.7 Análise das proteínas do trânsito de cálcio intracelular miocárdico

As proteínas do trânsito de cálcio foram avaliadas por meio da técnica de Western Blot em fragmentos do ventrículo esquerdo.

2.7.1 Técnica de Western Blot

A expressão das proteínas canal L, RyR, NCX, SERCA2a, CSQ, PLB, pPLBthr17 e pPLBser16 foi realizada pela técnica de Western Blot. Além disso, também foi realizada a expressão da proteína de normalização, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Este método é frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico (145) sendo constituído das seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos blots de polipetídeos (146). A metodologia de Western Blot está pormenorizadamente descrita abaixo.

2.7.1.1 Extração das proteínas

Fragmentos do VE foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise RIPA (Amresco, Solon, OH, USA) e coquetéis inibidores de protease e fosfatase. O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos eppendorfs e armazenado em freezer -80°C. A

concentração de proteína foi analisada utilizando o *kit* BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

2.7.1.2 Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL, 240mM, pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL, 240mM, pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6 a 10%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 3 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.7.1.3 Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCl, 20mM, pH 7,6 e NaCl 137 mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, pH 7,4 (Tris-HCl, 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M, pH 2,8;

NaCl 5M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas, sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em foto documentador Image Quant™ LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK) e as análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Anticorpos primários utilizados

- Serca2 ATPase, mouse IgG1 (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- Phospholamban, mouse IgG2a (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 2:1000.
- Phospho-Phospholamban (Ser16), rabbit (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- Phospho-Phospholamban (Thr17), rabbit (Badrilla, Leeds-UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- Exchanger Na⁺/Ca²⁺, mouse IgG2b (Upstate, Lake Placid, NY, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:2000.
- Calcium Channel, Voltage Gated Alpha 1C, rabbit (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:100.

- Ryanodine Receptor, mouse IgG1 (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- Calsequestrin, mouse IgG1 (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:300.

Anticorpo de normalização

- GAPDH, mouse IgG1 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.

Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase (IgG anti-mouse ou anti-rabbit, ECL, Amersham Biosciences, NY, USA), anti-anticorpos primários, foram utilizados na titulação de 1:10000. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas metodológicas.

2.7.1.4 Quantificação das proteínas

As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), software livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

2.8 Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca

O diagnóstico de insuficiência cardíaca (IC), dos animais EAo e EAoTF, foi baseado na presença de alteração do padrão respiratório, e confirmado pelos achados patológicos *post mortem*, como derrame pleural, ascite e trombo no átrio esquerdo.

2.9 Análise macroscópica do coração *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de hipertrofia a nível atrial e ventricular e foi realizada somente 28 semanas após a indução da EAo. Os animais foram submetidos à anestesia com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. O coração dos animais foi removido e dissecado. Para indicar o grau de hipertrofia cardíaca foram avaliados o peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD), dos átrios (AT) e do coração e suas relações pelo comprimento da tibia.

2.10 Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Como os animais submetidos a indução da EAo podem desenvolver retenção hídrica, característica de insuficiência cardíaca, a avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras de VE, ventrículo direito (VD), átrios (AT), pulmão e fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi aferido o peso *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa sob temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$, por período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

2.11 Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. A comparação entre os grupos Sham e EAo na 18ª semana pós-indução da estenose aórtica foi realizada pelo teste *t* de Student ou Mann-Whitney para amostras independentes.

As análises do ecocardiograma de 28 semanas, do músculo papilar isolado, em condição basal, do cardiomiócito isolado, do Western Blot, do teor de água nos tecidos e da macroscopia *post mortem* foram realizadas pelas técnicas de análise de variância (ANOVA) para o modelo de dois fatores ou Kruskal-Wallis e complementada com os testes de comparações múltiplas de Bonferroni ou Dunn, respectivamente (147). Para avaliar o desempenho dos músculos papilares

durante as manobras inotrópicas positivas e negativas foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias para o modelo de medidas repetidas complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Análise da estrutura e função cardíaca *in vivo*

A Tabela 3 apresenta os dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo após 18 semanas de cirurgia. Os animais do grupo EAo apresentaram diminuição do PC, do tempo de decaimento da onda E (TDE), do VEPP, do percentual de encurtamento mesocárdico (% Enc. Meso), da fração de ejeção (FE) e da onda A', e aumento da espessura relativa (Esp.rel.VE) e do índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE), do átrio esquerdo (AE) e sua relação com o diâmetro da aorta (AE/AO), da onda E e das razões E/A, E/E' e E'/A' em relação ao grupo Sham. Os animais que constituíam os dois grupos experimentais foram redistribuídos em mais dois grupos quanto a ausência ou presença do treinamento físico, Sham, ShamTF, EAo e EAoTF. A análise estatística não detectou diferença entre os dois grupos Sham e entre os dois grupos EAo para todas as variáveis (dados não mostrados).

Tabela 3. Dados ecocardiográficos da 18ª semana.

Variáveis	Grupos		Valor de p
	Sham	EAO	
PC (g)	473 ± 47	450 ± 48	0,008
FC (bpm)[#]	290 (271; 301)	290 (271; 312)	0,416
DDVE (mm)[#]	7,30 (6,90; 7,59)	7,41 (6,90; 7,98)	0,165
Esp.rel.VE	0,43 ± 0,03	0,79 ± 0,10	<0,001
IMVE	1,66 ± 0,21	4,78 ± 0,93	<0,001
AE (mm)[#]	4,70 (4,60; 4,94)	7,59 (6,58; 8,18)	<0,001
AE/AO[#]	1,21 (1,18; 1,28)	1,87 (1,62; 2,01)	<0,001
FE (%)[#]	94 (92; 94)	91 (89; 94)	<0,001
% Enc. Meso	27,9 ± 4,16	25,1 ± 3,94	<0,001
VEPP (mm/s)	70,1 ± 8,08	53,5 ± 11,6	<0,001
TDE (ms)	47,6 ± 4,61	36,8 ± 10,5	<0,001
Onda E (cm/s)	82,2 ± 7,36	125 ± 21,9	<0,001
E/A	1,62 ± 0,18	3,56 ± 1,71	<0,001
E' (cm/s)[#]	5,60 (5,30; 6,10)	5,40 (3,70; 6,35)	0,106
A' (cm/s)[#]	3,79 (3,52; 4,20)	3,20 (2,97; 4,52)	0,009
E/E'[#]	14,4 (13,3; 15,3)	23,2 (19,7; 29,2)	<0,001
E'/A'[#]	1,50 (1,40; 1,57)	1,69 (1,15; 1,94)	0,023

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 69); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar (n= 61). PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; Esp. Rel. VE: relação entre a espessura da parede e o diâmetro do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; TDE: tempo de decaimento da onda E; Onda E: velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce; E/A: relação entre as velocidades de fluxo transmitral nas fases de enchimento ventricular precoce e de contração atrial; E': velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce; A': velocidade do anel mitral durante a contração atrial; E/E': relação entre a velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce e a velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce. E'/A': relação entre a velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce e a velocidade do anel mitral durante a contração atrial. Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste "t" de Student. [#]: Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75, teste de Mann-Whitney. *p<0,05 vs Sham.

A Tabela 4 mostra os dados do exame ecocardiográfico na 28ª semana de protocolo experimental, após 10 semanas de treinamento físico aeróbio.

Os grupos EAo e EAoTF apresentaram aumento da Esp.rel.VE, do IMVE, do AE, AE/AO, da onda E e das razões E/A e E/E', e redução da onda E', da FE, do VEPP e do TDE, quando comparados aos respectivos grupos controle. Além disso, o grupo EAo apresentou diminuição do PC, do % Enc. Meso e da onda A' e aumento do DDVE e da razão E'/A' em relação ao grupo Sham. Não houve diferença estatística entre os grupos para FC.

O TFa foi eficiente em promover efeitos positivos sobre o VEPP, o TDE, a onda A' e as razões E/A e E'/A' no grupo EAoTF. Estes resultados apontam que o TFa atenua a disfunção diastólica e pode ter benefícios também sobre a função sistólica de ratos com estenose aórtica supralvar e disfunção ventricular.

Tabela 4. Dados ecocardiográficos da 28ª semana.

Variáveis	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAO	EAO TF
PC (g)	528 ± 45	503 ± 64	488 ± 57*	478 ± 52
FC (bpm)	303 ± 44	290 ± 34	295 ± 39	301 ± 35
DDVE (mm)[§]	7,43 (7,15; 7,66)	7,41 (7,09; 7,92)	8,43 (7,66; 9,20)*	7,98 (7,41; 8,69)
Esp.rel.VE[§]	0,42 (0,40; 0,44)	0,41 (0,40; 0,44)	0,67 (0,60; 0,81)*	0,67 (0,60; 0,75) ^{&}
IMVE[§]	1,58 (1,47; 1,69)	1,63 (1,45; 1,83)	4,66 (3,94; 5,82)*	3,86 (3,38; 5,53) ^{&}
AE (mm)[§]	4,85 (4,85; 5,11)	4,85 (4,85; 5,11)	8,43 (7,86; 8,75)*	7,53 (6,90; 8,18) ^{&}
AE/AO[§]	1,21 (1,19; 1,27)	1,25 (1,19; 1,27)	1,94 (1,81; 2,06)*	1,88 (1,65; 2,00) ^{&}
FE (%)[§]	93 (92; 95)	93 (92; 95)	89 (78; 92)*	90 (86; 93) ^{&}
% Enc. Meso	26,3 ± 3,15	25,5 ± 3,94	22,6 ± 4,36*	23,8 ± 4,04
VEPP (mm/s)	68,9 ± 8,68	70,9 ± 8,98	38,3 ± 10,3*	47,8 ± 9,24 ^{&#}
TDE (ms)	47,8 ± 5,49	49,5 ± 5,01	27,7 ± 6,45*	33,9 ± 10,7 ^{&#}
Onda E (cm/s)	85,4 ± 7,37	81,3 ± 8,25	126 ± 22,7*	122 ± 24,9 ^{&}
E/A	1,52 ± 0,20	1,54 ± 0,17	5,08 ± 1,56*	4,27 ± 1,94 ^{&#}
E' (cm/s)	6,15 ± 0,82	6,15 ± 0,69	5,23 ± 1,05*	5,19 ± 1,20 ^{&}
A' (cm/s)[§]	4,25 (3,70; 4,50)	4,00 (3,70; 4,50)	2,90 (2,55; 3,22)*	3,60 (2,70; 4,55) [#]
E/E'[§]	13,7 (12,9; 14,9)	13,6 (12,2; 14,6)	23,6 (21,4; 27,4)*	24,1 (20,2; 26,8) ^{&}
E'/A'[§]	1,49 (1,37; 1,60)	1,51 (1,37; 1,62)	1,86 (1,65; 2,14)*	1,57 (1,07; 1,91) [#]

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 36); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 33); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar (n= 29); EAO TF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 32). PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; Esp. Rel. VE: relação entre a espessura da parede e o diâmetro do ventrículo esquerdo; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; AE/AO: relação entre os diâmetros do átrio esquerdo e da aorta; FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; % Enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; TDE: tempo de decaimento da onda E; Onda E: velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce; E/A: relação entre as velocidades de fluxo transmitral nas fases de enchimento ventricular precoce e de contração atrial; E': velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce; A': velocidade do anel mitral durante a contração atrial; E/E': relação entre a velocidade de fluxo transmitral durante o enchimento ventricular precoce e a velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce; E'/A': relação entre a velocidade do anel mitral durante o enchimento ventricular precoce e a velocidade do anel mitral durante a contração atrial. Dados expressos em média ± desvio padrão. Os testes aplicados foram a ANOVA para esquema de dois fatores independentes complementada com Bonferroni ou, para dados não normais, Kruskal-Wallis complementado com Dunn. *Sham vs EAO, #EAO vs EAO TF, &ShamTF vs EAO TF, §Sham vs ShamTF. [§]Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75.

3.2 Análise da função cardíaca *in vitro*

3.2.1 Músculo papilar isolado

3.2.1.1 Condição basal

O estudo da função miocárdica *in vitro* pelo músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo, em condição basal, está apresentado na Tabela 5. Os grupos compostos por animais com estenose aórtica apresentaram prejuízos na $+dT/dt$ e no TPT quando comparados aos respectivos grupos controle. Além disso, ocorreu diminuição da TD e aumento da TR no grupo EAo em relação ao Sham. O TFa reduziu a TR dos animais com estenose aórtica (EAo vs EAoTF).

Tabela 5 - Contração isométrica basal.

Variáveis	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
TD (g/mm ²)	6,19 ± 1,83	5,49 ± 1,64	4,56 ± 1,42*	4,67 ± 2,07
TR (g/mm ²)	0,57 ± 0,21	0,53 ± 0,19	0,73 ± 0,23*	0,59 ± 0,20 [#]
+dT/dt (g/mm ² /s)	65,5 ± 20,4	58,7 ± 18,4	40,1 ± 13,7*	42,4 ± 21,1 ^{&}
-dT/dt (g/mm ² /s)	22,2 ± 5,35	20,4 ± 5,29	21,0 ± 6,67	21,0 ± 8,00
TPT (ms) ^{\$}	180 (180; 200)	180 (170; 190)	200 (180; 220)*	200 (180; 220) ^{&}
AS (mm ²)	1,19 ± 0,18	1,30 ± 0,26	1,28 ± 0,23	1,38 ± 0,28

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 30); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 27); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar (n= 23); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 26). TD: tensão máxima desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico de tensão; AS: área seccional do músculo papilar. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal-Wallis com complemento de Dunn. *p<0,05 EAo vs Sham; [#]p<0,05 EAo vs EAoTF; [&]p<0,05 EAoTF vs ShamTF. ^{\$}Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75.

3.2.1.2 Potenciação pós-pausa

As repercussões da potenciação pós-pausa sobre a função do músculo papilar dos animais estão ilustradas na Figura 5.

A estenose aórtica provocou alterações negativas em diferentes pontos de análise (basal, 10, 30 e 60 segundos) para todas as variáveis estudadas. Na comparação entre os grupos sedentários, o EAo apresentou prejuízos na TD (10, 30 e 60 segundos; Figura 5A), na $+dT/dt$ (basal, 10, 30 e 60 segundos; Figura 5B) e na $-dT/dt$ (30 e 60 segundos; Figura 5C), em relação ao Sham, ao passo que, entre os grupos treinados, o EAoTF apresentou prejuízos apenas na $+dT/dt$ (10, 30 e 60 segundos; Figura 5B) quando comparado ao ShamTF. É evidente que em condição sedentária (EAo vs Sham), os animais com estenose aórtica apresentaram prejuízo mais pronunciado que em condição de treinamento físico (EAoTF vs ShamTF). Não houve diferença estatística entre os grupos EAo e EAoTF para as variáveis nos diferentes momentos estudados.

Na análise da resposta de cada grupo aos diferentes momentos de paralisação do estímulo elétrico (10, 30 e 60 segundos), os animais Sham e ShamTF apresentaram incremento progressivo das 3 variáveis estudadas em todos os pontos de avaliação (Figuras 5A, B e C). Resultado interessante foi a fraca resposta do grupo EAo à potenciação pós-pausa; apenas na paralisação de 30 segundos em comparação ao basal para TD, sendo que o grupo EAoTF apresentou respostas positivas para as 3 variáveis (Figuras 5A, B e C).

■ Sham □ ShamTF ■ EAo ▨ EAoTF

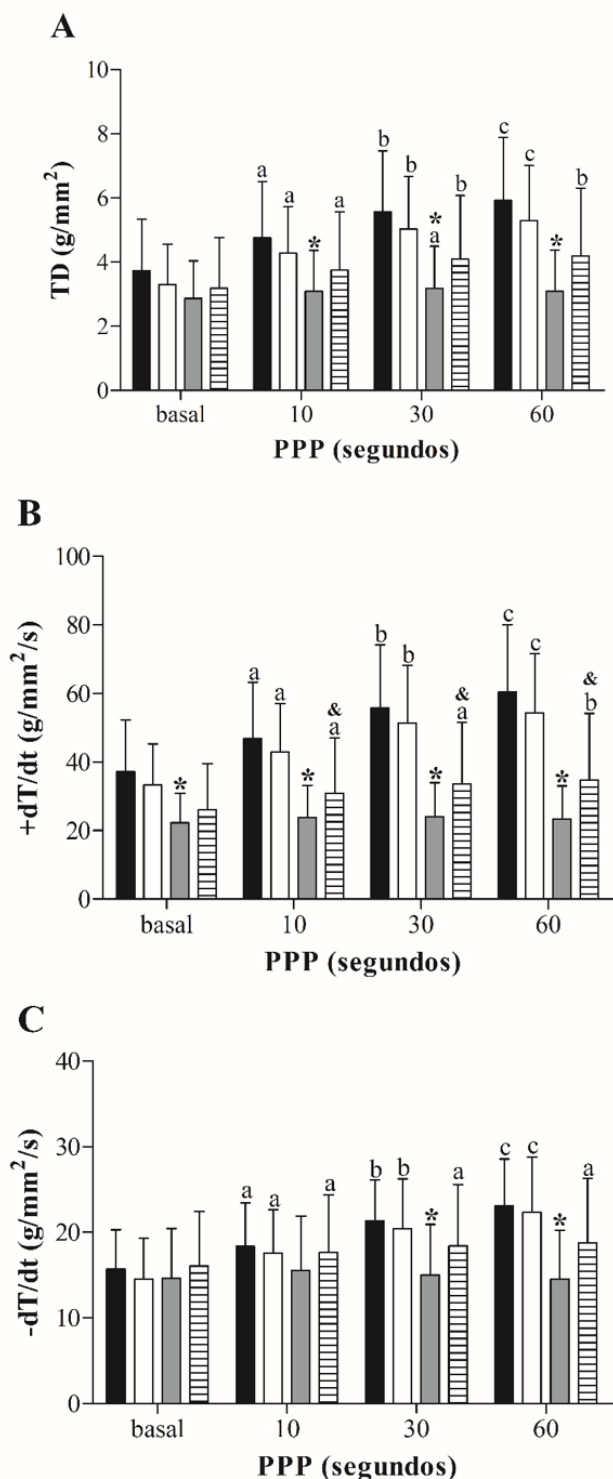


Figura 5. Potenciação pós-pausa (PPP). Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 30; coluna preta); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 27; coluna branca); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 21; coluna cinza); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 21; coluna listrada). TD: tensão desenvolvida (Fig. 5A); +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (Fig. 5B); -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (Fig. 5C). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

*p< 0,05 EAo vs Sham

&p< 0,05 EAoTF vs ShamTF

^ap< 0,05 vs basal

^bp< 0,05 vs basal e 10 segundos

^cp< 0,05 vs basal e 10 e 30 segundos

3.2.1.3 Elevação da concentração de cálcio extracelular

A Figura 6 mostra os efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular sobre a função do músculo papilar dos grupos experimentais.

Na comparação entre os grupos sedentários (Sham vs EAo), os animais EAo apresentaram a TD e $+dT/dt$ (Figuras 6A e B) diminuídas em todas as concentrações de Ca^{2+} , exceto na TD em 0,5 mM. Em condição de treinamento físico, os animais EAoTF apresentaram resposta diminuída na $+dT/dt$ (Figura 6B) nas concentrações de 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 de Ca^{2+} , em relação ao ShamTF. Não houve diferença estatística nas variáveis analisadas entre os grupos EAo e EAoTF nas diferentes concentrações de Ca^{2+} . Desta forma, os dados suportam que não houve efeito do TFa sobre os prejuízos da função miocárdica pela EAo em diferentes concentrações de cálcio.

Diferentemente dos achados pela análise de potenciação pós-pausa, os 4 grupos experimentais responderam à elevação de cálcio extracelular, porém, os grupos EAo e EAoTF em menor magnitude (Figuras 6A, B e C). Não houve variação significativa para nenhuma das variáveis a partir da elevação para 3,0 mM, o que mostra que o nível de saturação tecidual de Ca^{2+} para ativar o aparato contrátil é 2,5 mM (Figuras 6A, B e C).

■ Sham □ ShamTF ■ EAo ▨ EAoTF

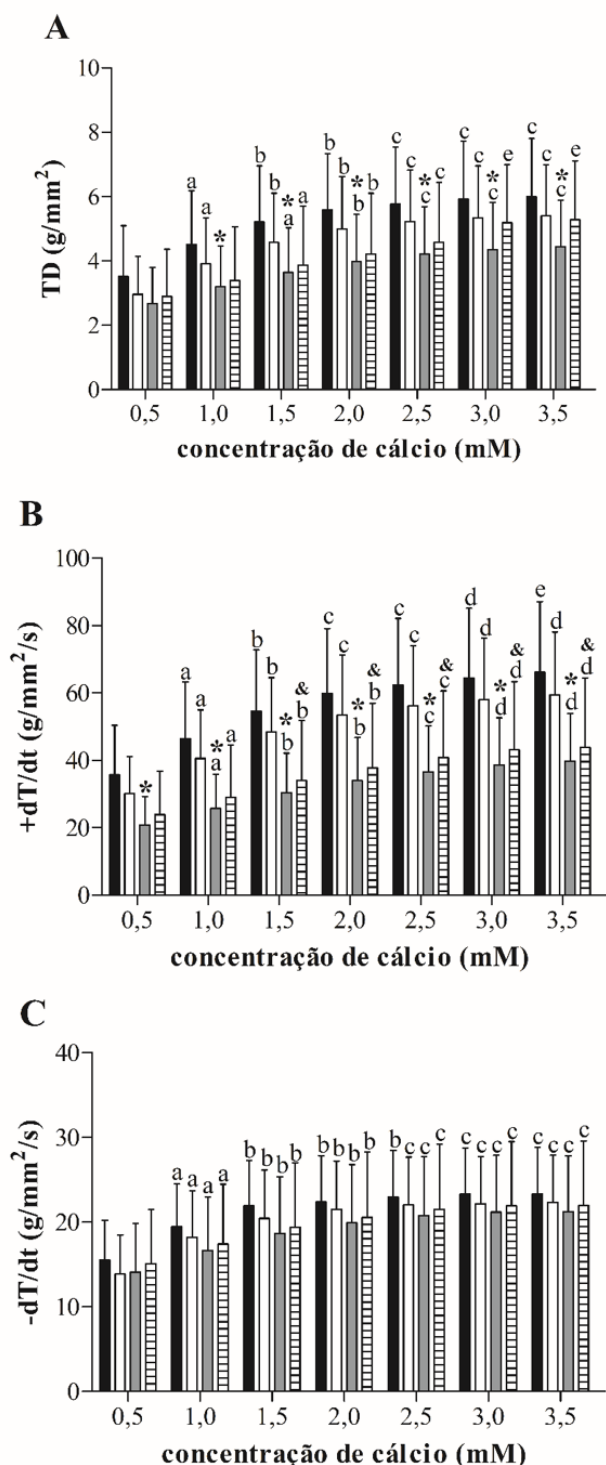


Figura 6. Elevação de cálcio extracelular. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 30; coluna preta); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 27; coluna branca); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 21; coluna cinza); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 23; coluna listrada). TD: tensão desenvolvida (Fig. 6A); +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (Fig. 6B); -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (Fig. 6C). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

*p < 0,05 EAo vs Sham

&p < 0,05 EAoTF vs ShamTF

^ap < 0,05 vs 0,5 mM

^bp < 0,05 vs 0,5 e 1,0 mM

^cp < 0,05 vs 0,5, 1,0 e 1,5 mM

^dp < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM

^ep < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM

^fp < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mM

3.2.1.4 Experimento Diltiazem

A Figura 7 apresenta os efeitos do bloqueio dos canais de Ca²⁺ tipo L pelo diltiazem sobre o músculo papilar.

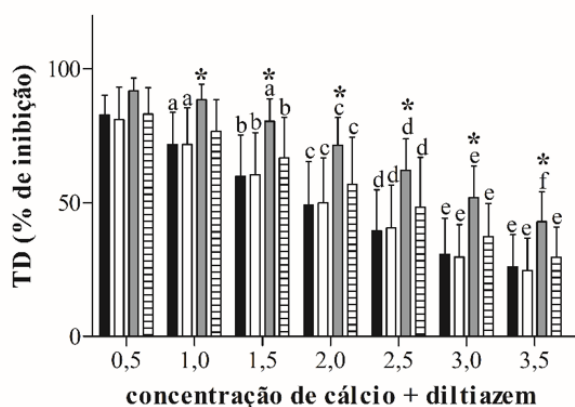
O diltiazem foi eficiente em acarretar depressão significativa das variáveis em todos os grupos e pontos estudados (Figura 7A, B e C). A inibição máxima da TD em resposta ao diltiazem na concentração de 0,5 mM de Ca^{2+} em cada grupo foi: Sham= 82,9% \pm 6,83; ShamTF= 81,1% \pm 12,2; EAo= 91,8% \pm 4,81 e EAoTF= 83,2% \pm 9,90 (Figura 7A).

O grupo EAo apresentou níveis de bloqueio do desempenho significativamente mais acentuados que o grupo Sham para todas as variáveis estudadas em praticamente todos os momentos, exceto na concentração de 0,5 mM de Ca^{2+} para TD, +dT/dt e -dT/dt e de 3,5 mM para +dT/dt (Figura 7A, B e C), o que indica que estes animais apresentam prejuízo da função dos canais de Ca^{2+} tipo L após 28 semanas de cirurgia.

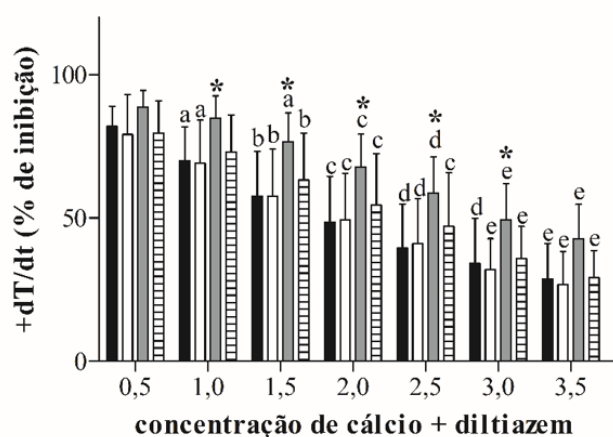
O treinamento físico foi capaz de atenuar estes efeitos deletérios da estenose aórtica, desde que os músculos papilares dos animais EAoTF expressaram desempenho semelhante aos dos grupos Sham durante a manobra, bem como apresentaram, com amparo estatístico, menor depressão da -dT/dt quando comparados aos animais EAo nas concentrações de 1,0-3,5 mM de Ca^{2+} (Figura 7C). Adicionalmente, não houve diferença entre os grupos ShamTF e EAoTF para todas as variáveis em todos os momentos avaliados.

■ Sham □ ShamTF ■ EAO ▨ EAO TF

A



B



C

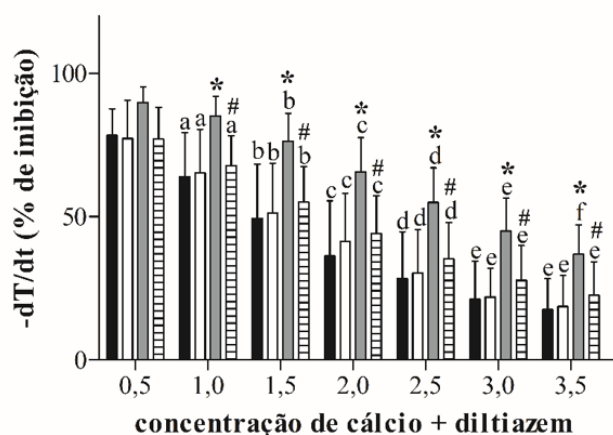


Figura 7. Experimento Diltiazem. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 15; coluna preta); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 13; coluna branca); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 10; coluna cinza); EAO TF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 10; coluna listrada). TD: tensão desenvolvida (Fig. 7A); +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (Fig. 7B); -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (Fig. 7C). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

*p < 0,05 EAO vs Sham

#p < 0,05 EAO vs EAO TF

^ap < 0,05 vs 0,5 mM

^bp < 0,05 vs 0,5 e 1,0 mM

^cp < 0,05 vs 0,5, 1,0 e 1,5 mM

^dp < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM

^ep < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM

3.2.1.5 Experimento Ácido Ciclopiazônico

A Figura 8 apresenta os efeitos do bloqueio da SERCA2a pelo ácido ciclopiazônico sobre a função do músculo papilar.

O Ácido Ciclopiazônico foi eficiente em acarretar diminuição do desempenho das variáveis em todos os grupos e pontos estudados. Entretanto, os achados propõem que a estenose aórtica e o treinamento físico não acarretam alterações na resposta funcional entre os grupos experimentais para todas as variáveis analisadas (TD, $+dT/dt$ e $-dT/dt$).

■ Sham □ ShamTF ■ EAo ▨ EAoTF

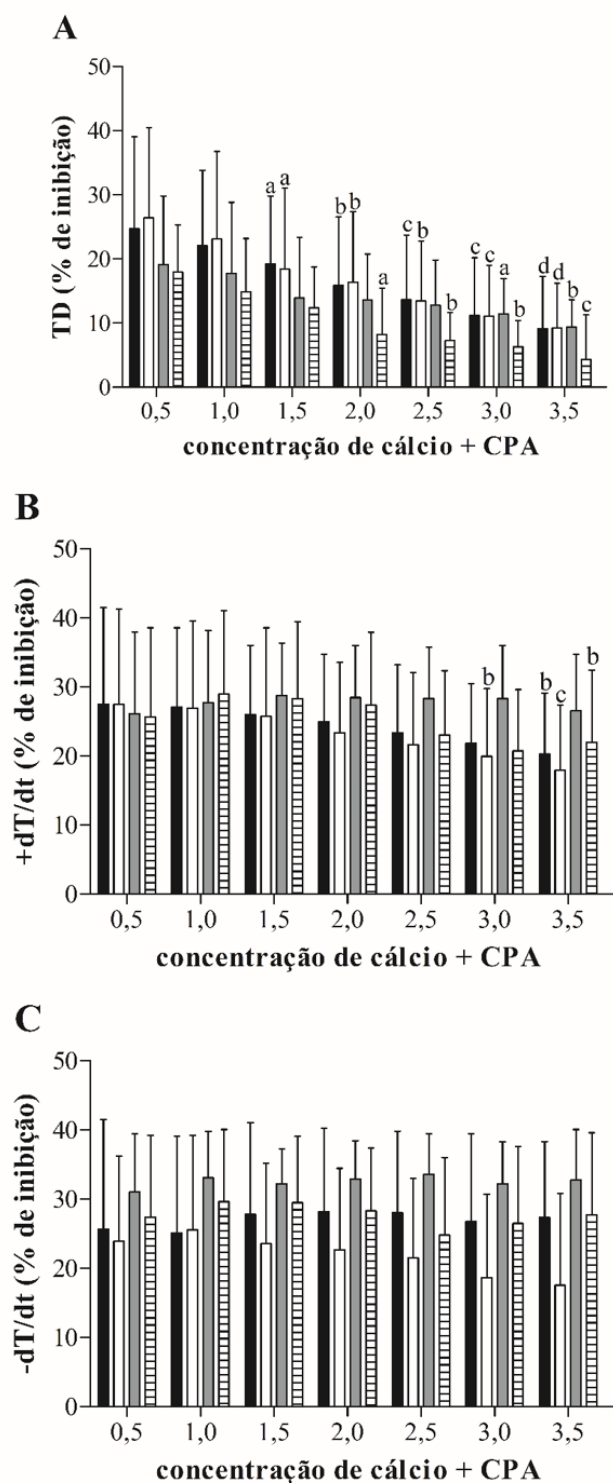


Figura 8. Experimento Ácido Ciclopiazônico. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 15; coluna preta); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 14; coluna branca); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 9; coluna cinza); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 8; coluna listrada). TD: tensão desenvolvida (Fig. 8A); +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida (Fig. 8B); -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (Fig. 8C); ACP: ácido ciclopiazônico. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

^ap < 0,05 vs 0,5 mM

^bp < 0,05 vs 0,5 e 1,0 mM

^cp < 0,05 vs 0,5, 1,0 e 1,5 mM

^dp < 0,05 vs 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM

3.2.2 Cardiomiócito isolado

O estudo do cardiomiócito isolado, função mecânica e trânsito de cálcio, está expresso nas Figuras 9, 10 e 11.

O grupo EAo apresentou queda da fração de encurtamento (FEnc) e das velocidades máximas de encurtamento e relaxamento (VME e VMR, respectivamente) e aumento dos tempos para o encurtamento de 50% do pico e para o relaxamento a 50% do basal ($T_{ENC50\%}$ e $T_{REL50\%}$, respectivamente), em relação ao Sham (Figuras 9B, D, E e F); o treinamento físico no grupo EAoTF melhorou a VME, a VMR, a FEnc e o $T_{REL50\%}$ quando comparado ao grupo EAo (Figuras 9B, C, E e F). Na comparação entre EAoTF e ShamTF, houve diferença estatística para as variáveis $T_{ENC50\%}$ e $T_{REL50\%}$. Os resultados da análise mecânica dos cardiomiócitos mostram melhoria significativa das funções de encurtamento e relaxamento no grupo EAoTF.

Na análise do trânsito de cálcio, o grupo EAo apresentou aumento dos tempos para atingir o pico (TAPC) e 50% do decaimento de Ca^{2+} ($TADC_{50\%}$) em relação ao Sham, resposta verificada também na comparação EAoTF *vs* ShamTF. O treinamento físico teve efeitos positivos sobre as relações da concentração de Ca^{2+} sistólico pela fração de encurtamento (CS/FEnc) e pela velocidade máxima de encurtamento (CS/VME), o que supõe que os animais com estenose aórtica supravalvar que praticaram TFa apresentavam maior responsividade ao Ca^{2+} que os animais sedentários ao final do experimento (Figura 10).

A Figura 11 expressa as curvas representativas do experimento do cardiomiócito isolado (função mecânica e trânsito de Ca^{2+}).

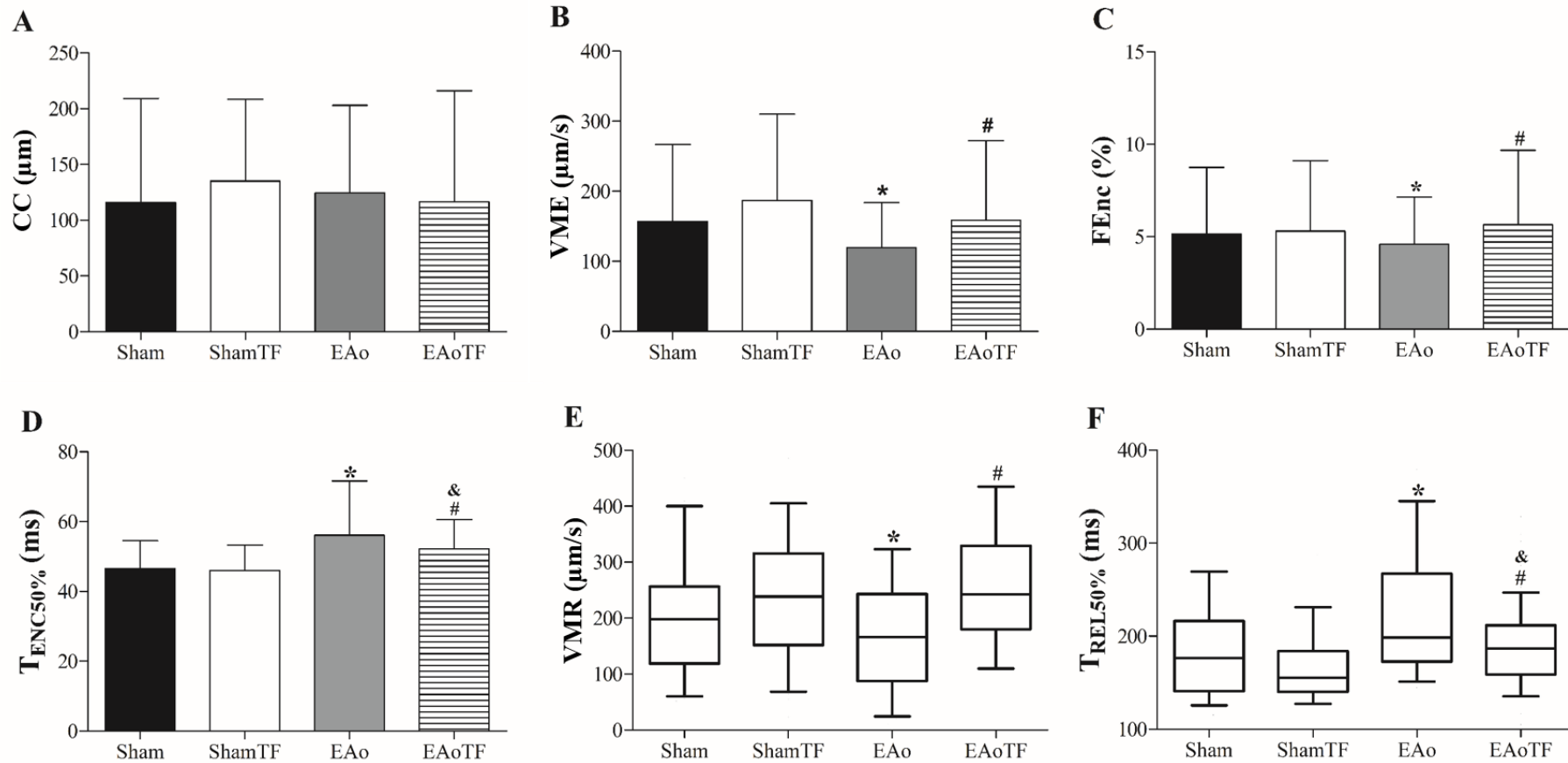


Figura 9. Função mecânica dos cardiomiócitos. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 6; nc= 71); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento (n= 5; nc= 76); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar (n= 6; nc= 96); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 6; nc= 100). “nc”: número de células de cada animal. CC: comprimento do cardiomiócito; VME: velocidade máxima de encurtamento; FEnc: fração de encurtamento; T_{ENC50%}: tempo de encurtamento até 50% do pico; VMR: velocidade máxima de relaxamento; T_{REL50%}: tempo de relaxamento até 50% do basal. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para físico grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal-Wallis com complemento de Dunn. *p<0,05 EAo vs Sham; #p<0,05 EAoTF vs EAo; &p<0,05 EAoTF vs ShamTF. # Dados expressos em mediana e percentis 10 e 90.

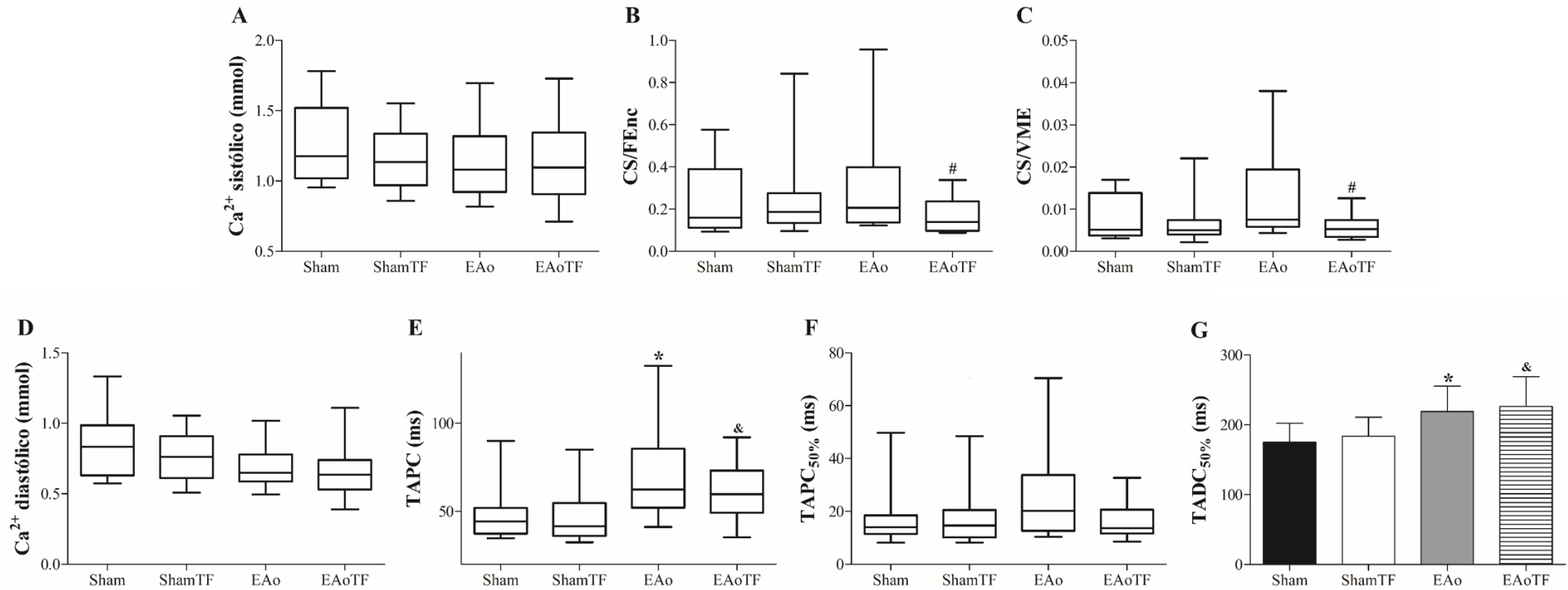


Figura 10. Trânsito de cálcio dos cardiomiócitos. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 6; nc= 29); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 5; nc= 36); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar (n= 6; nc= 41); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supra-avalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 6; nc= 46). “nc”: número de células de cada animal. CS/FEnc: razão entre cálcio sistólico e fração de encurtamento; CS/VME: razão entre o cálcio sistólico e a velocidade máxima de encurtamento; TAPC: tempo para atingir o pico de cálcio; TAPC_{50%}: tempo para atingir 50% do pico de cálcio; TADC_{50%}: tempo para atingir 50% do decaimento de cálcio. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal-Wallis com complemento de Dunn. * $p < 0,05$ EAo vs Sham; # $p < 0,05$ EAoTF vs EAo; & $p < 0,05$ EAoTF vs ShamTF. # Dados expressos em mediana e percentis 10 e 90.

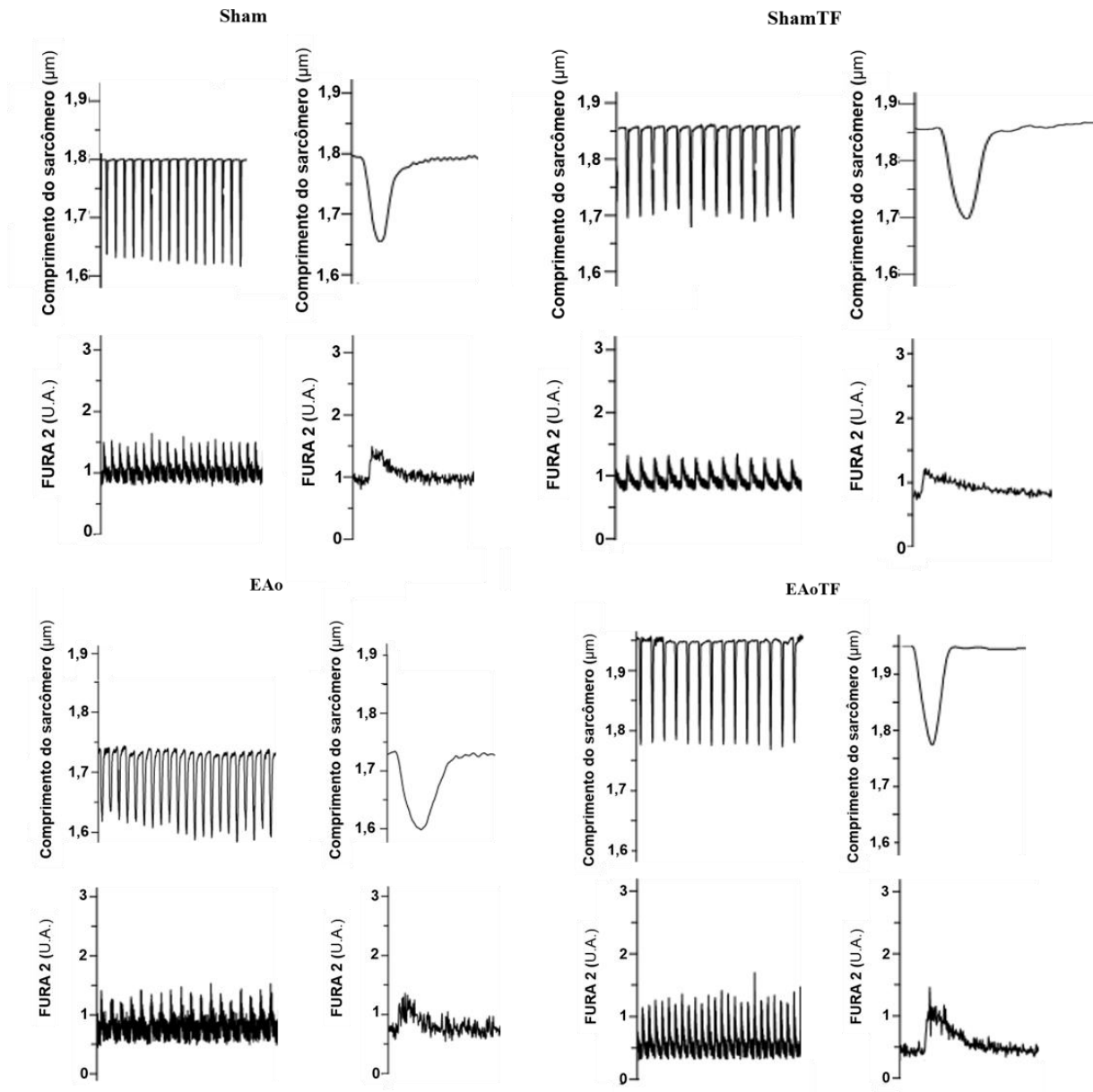


Figura 11. Curvas representativas da função mecânica e do trânsito de cálcio dos cardiomiócitos. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 6); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 5); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supralvalvar (n= 6); EAO TF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supralvalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 6)

3.3 Avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca

O diagnóstico de IC foi baseado na presença de alteração do padrão respiratório, e confirmado pelos achados patológicos *post mortem*, como derrame pleural, ascite, trombo atrial e congestão hepática. Após 28 semanas de cirurgia, o grupo EAO apresentou sinais clínicos e

patológicos de IC em maior intensidade (Tabela 6) e frequência (Figura 12) que o grupo EAoTF. Além disso, três (3) animais EAo apresentaram calcificação no ventrículo esquerdo e um (1) apresentou trombo no ventrículo direito. Nenhuma alteração foi observada nos grupos Sham.

Tabela 6. Dados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca (%).

Sinais clínicos	Grupos	
	EAo	EAoTF
Alteração do padrão respiratório	45 (+); 38 (++); 7 (+++)	53 (+); 6 (++)
Ascite	48 (+); 3 (++); 3 (+++)	19 (+)
Derrame pleural	41 (+); 34 (++); 17 (+++)	50 (+); 22 (++); 3 (+++)
Trombo atrial	14 (+); 34 (++); 14 (+++)	6 (+); 13 (++)
Congestão hepática	24 (+); 14 (++); 7 (+++)	9 (+); 16 (++); 3 (+++)

EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supraavalvar (n= 29); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supraavalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 32). Dados expressos em frequência relativa (%). Intensidade do sintoma: + = leve; ++ = moderado; +++ = intenso.

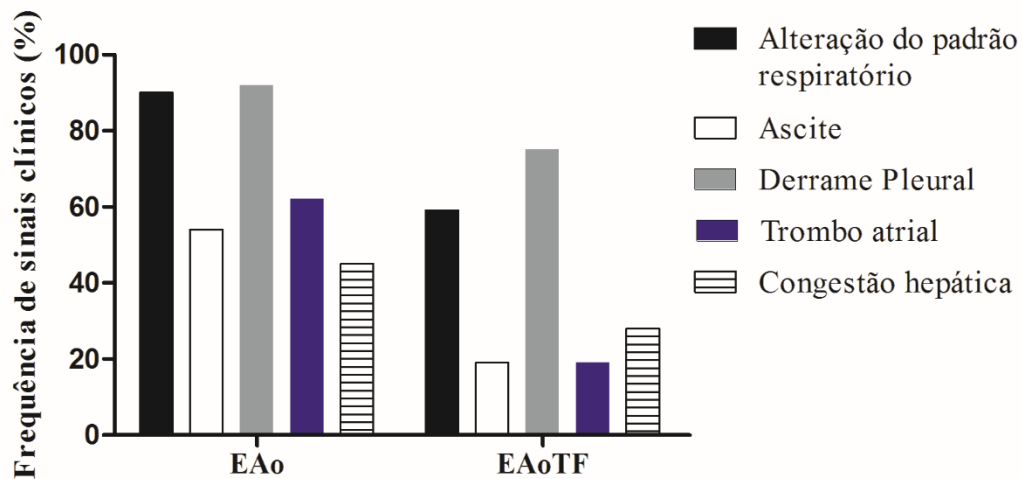


Figura 12. Frequência de sinais clínicos (%). EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supraavalvar (n= 29); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supraavalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 32).

3.4 Análise macroscópica do coração *post mortem*

Os dados de estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos grupos Sham, ShamTF, EAo e EAoTF estão apresentados na Tabela 7. A estenose aórtica supravalvar provocou alterações em todas as variáveis cardíacas analisadas nesta seção, tanto nas comparações entre os animais sedentários como os treinados (EAo vs Sham; EAoTF vs ShamTF). O TFa foi capaz de atenuar estas repercussões negativas ao promover diminuição da hipertrofia cardíaca do grupo EAoTF em comparação ao EAo, averiguada pela diminuição significativa das seguintes variáveis: coração, VD e AT e suas respectivas relações com a tibia.

Tabela 7. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem*.

Variáveis	Grupos			
	Sham	ShamTF	EAo	EAoTF
Tíbia (cm)	4,46 ± 0,12	4,42 ± 0,12	4,41 ± 0,17	4,39 ± 0,10
Coração (g)	1,30 ± 0,18	1,25 ± 0,12	2,49 ± 0,38*	2,27 ± 0,31 ^{#&}
VE (g)	0,91 ± 0,12	0,87 ± 0,09	1,53 ± 0,24*	1,45 ± 0,14 ^{&}
VD (g)	0,274 ± 0,058	0,257 ± 0,032	0,523 ± 0,102*	0,447 ± 0,121 ^{#&}
AT (g)	0,117 ± 0,020	0,122 ± 0,025	0,439 ± 0,106*	0,377 ± 0,108 ^{#&}
Coração/Tíbia	0,291 ± 0,036	0,284 ± 0,027	0,565 ± 0,085*	0,518 ± 0,076 ^{#&}
VE/Tíbia	0,203 ± 0,024	0,198 ± 0,020	0,347 ± 0,053*	0,330 ± 0,037 ^{&}
VD/Tíbia	0,061 ± 0,013	0,058 ± 0,008	0,119 ± 0,023*	0,102 ± 0,028 ^{#&}
AT/Tíbia	0,026 ± 0,004	0,028 ± 0,006	0,100 ± 0,024*	0,086 ± 0,025 ^{#&}

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 30); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 27); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 23); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 26). VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: soma do peso dos átrios direito e esquerdo; Coração/Tíbia: relação entre o peso do coração e o comprimento da tibia; VE/Tíbia: relação entre o peso do ventrículo esquerdo e o comprimento da tibia; VD/Tíbia: relação entre o peso do VD e o comprimento da tibia; AT/Tíbia: relação entre a soma do peso dos átrios direito e esquerdo e o comprimento da tibia. Análise de variância (ANOVA) duas vias para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio padrão. *p<0,05 EAo vs Sham; [#]p<0,05 EAo vs EAoTF; [&]p<0,05 EAoTF vs ShamTF.

3.5 Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A avaliação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 8. A estenose aórtica aumentou o teor de água do ventrículo direito dos animais EAo e EAoTF em relação aos respectivos controle, Sham e ShamTF.

Tabela 8. Teor de água dos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar.

Variáveis	Grupos			
	Sham	ShamTF	Eao	EAoTF
VE	77,1 (76,1; 78,3)	77,2 (75,4; 78,4)	78,3 (77,1; 79,5)	77,8 (77,2; 78,7)
VD	76,9 (77,3; 77,4)	76,8 (76,2; 77,3)	78,1 (77,7; 78,6)*	77,8 (77,2; 78,7)#
AT	79,1 (78,6; 80,3)	79,8 (79,1; 81,3)	79,4 (78,8; 79,8)	79,5 (79,0; 79,9)
Pulmão	79,2 (77,5; 80,1)	79,6 (78,0; 80,6)	79,8 (78,6; 80,7)	79,8 (79,1; 80,3)
Fígado	68,2 (67,7; 68,6)	68,2 (66,9; 68,7)	68,6 (67,4; 70,4)	68,9 (68,0; 69,8)

Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 30); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 27); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 23); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 26). VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75. Kruskal-Wallis complementado com Dunn. *p<0,05 EAo vs Sham; #p<0,05 ShamTF vs EAoTF.

3.6 Expressão das proteínas do trânsito de Ca²⁺ miocárdico

A Figura 13 apresenta a expressão das proteínas regulatórias do trânsito de Ca²⁺ miocárdico.

A estenose aórtica acarretou aumento do RyR, da SERCA2a e do NCX quando comparados os grupos Sham vs EAo (Figura 13A, B e C), e da PLB_{thr17} na comparação ShamTF vs EAoTF (Figura 13E). Em contrapartida, o TFa evitou o aumento do NCX e da SERCA2a no grupo EAoTF; os animais apresentaram menor quantidade destas proteínas em relação aos EAo (Figura 13B e C).

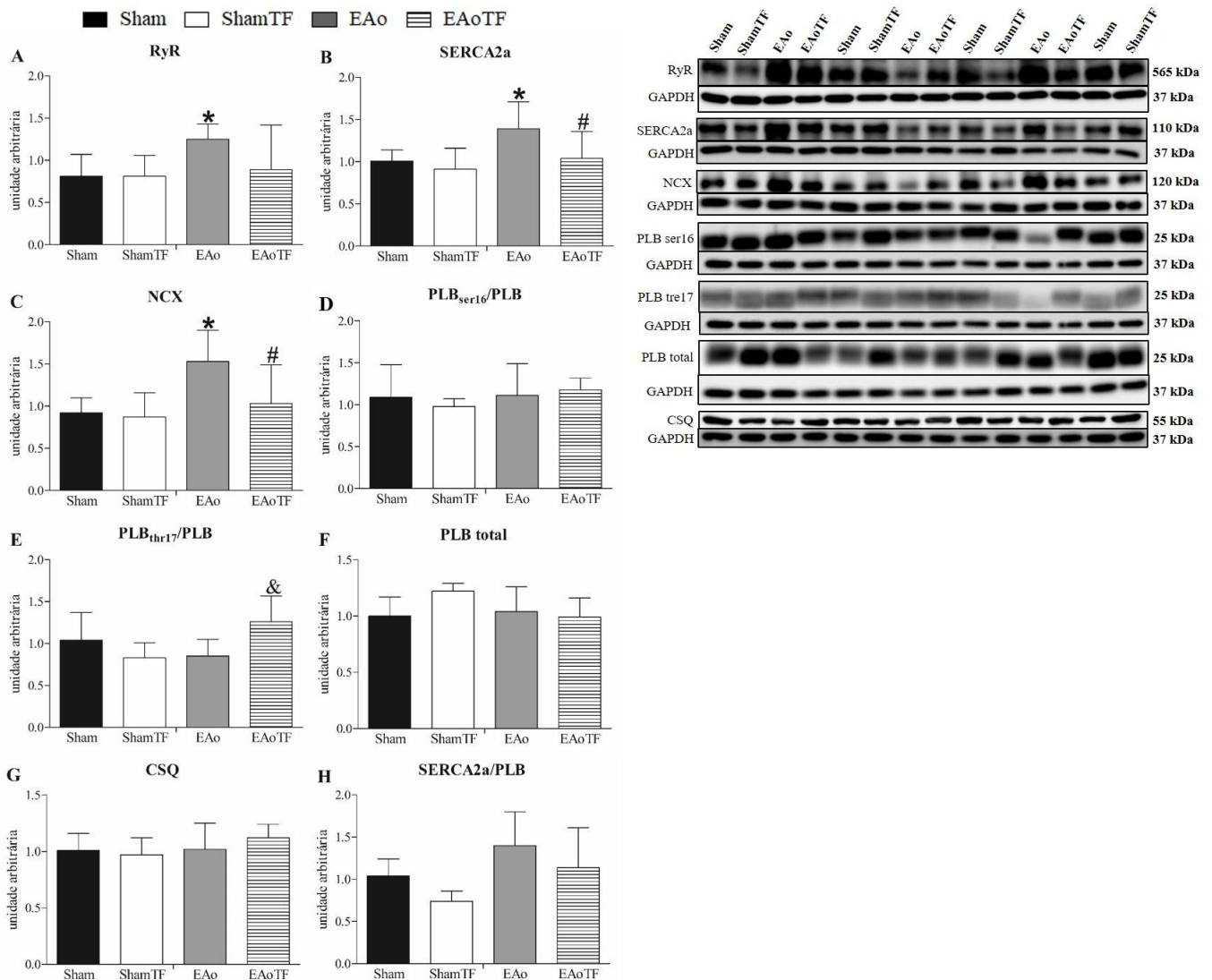


Figura 13. Expressão das proteínas regulatórias do trânsito de Ca^{2+} . Sham: animais submetidos à cirurgia simulada ($n=7$); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico ($n=7$); EAo: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar ($n=7$); EAoTF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico ($n=7$). RyR: Receptor de rianodina; SERCA2a: Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; NCX: Trocador de sódio e cálcio; PLB: Fosfolambam; PLB_{ser16}: Fosfolambam fosforilada na serina 16; PLB_{thr17}: Fosfolambam fosforilada na treonina 17; CSQ: Calsequestrina. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) de duas vias para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p<0,05$ EAo vs Sham; # $p<0,05$ EAoTF vs EAo; & $p<0,05$ EAoTF vs ShamTF.

3.7 Avaliação do condicionamento físico dos animais

A avaliação do condicionamento físico dos animais está apresentada na Figura 14.

A estenose aórtica provocou diminuição da resistência ao esforço dos grupos estenose, em relação aos respectivos controle, nos 4 testes de esforço, averiguada pela diminuição das variáveis V_{EX} , DP, TTT e V_{LL} (Figura 14A, B, C e D), exceto no teste de esforço inicial (TE inicial) para a última variável citada. Entretanto, o TFa melhorou o panorama das variáveis

na comparação entre os grupos controle e atenuou o prejuízo da condição física do grupo EAoTF em relação ao grupo EAo (Figura 14A, B, C e D).

Quanto a análise dos níveis de lactato durante as avaliações, no TE inicial, os animais EAoTF apresentaram maior quantidade relativa de lactato no ponto de limiar que os ShamTF (Figura 14J). No 2º teste de esforço (TE 2), houve redução da quantidade relativa de lactato no ponto pós-limiar no grupo EAoTF em relação ao EAo (Figura 14K).

No 3º teste de esforço, a estenose aórtica piorou os níveis absolutos de lactato basal ($[LAC]_B$) e pontual corrigido pela velocidade de corrida pós-limiar, L_{LP}/V_{LP} (Figura 14F e K); o TFa foi capaz de melhorar estes parâmetros. Além disso, o grupo EAoTF apresentou melhores níveis relativos de lactato no limiar e na exaustão, L_{LL}/V_{LL} e L_{EX}/V_{EX} , e absolutos no pós-limiar, L_{PL} que o grupo EAo (Figura 14H, J e L). Em relação aos animais Sham, o TFa reduziu os níveis de lactato na exaustão, L_{EX}/V_{EX} (Figura 14L). No final do experimento, o grupo estenose aórtica que foi submetido ao TFa apresentava menores valores na razão L_{LL}/V_{LL} (Figura 14H).

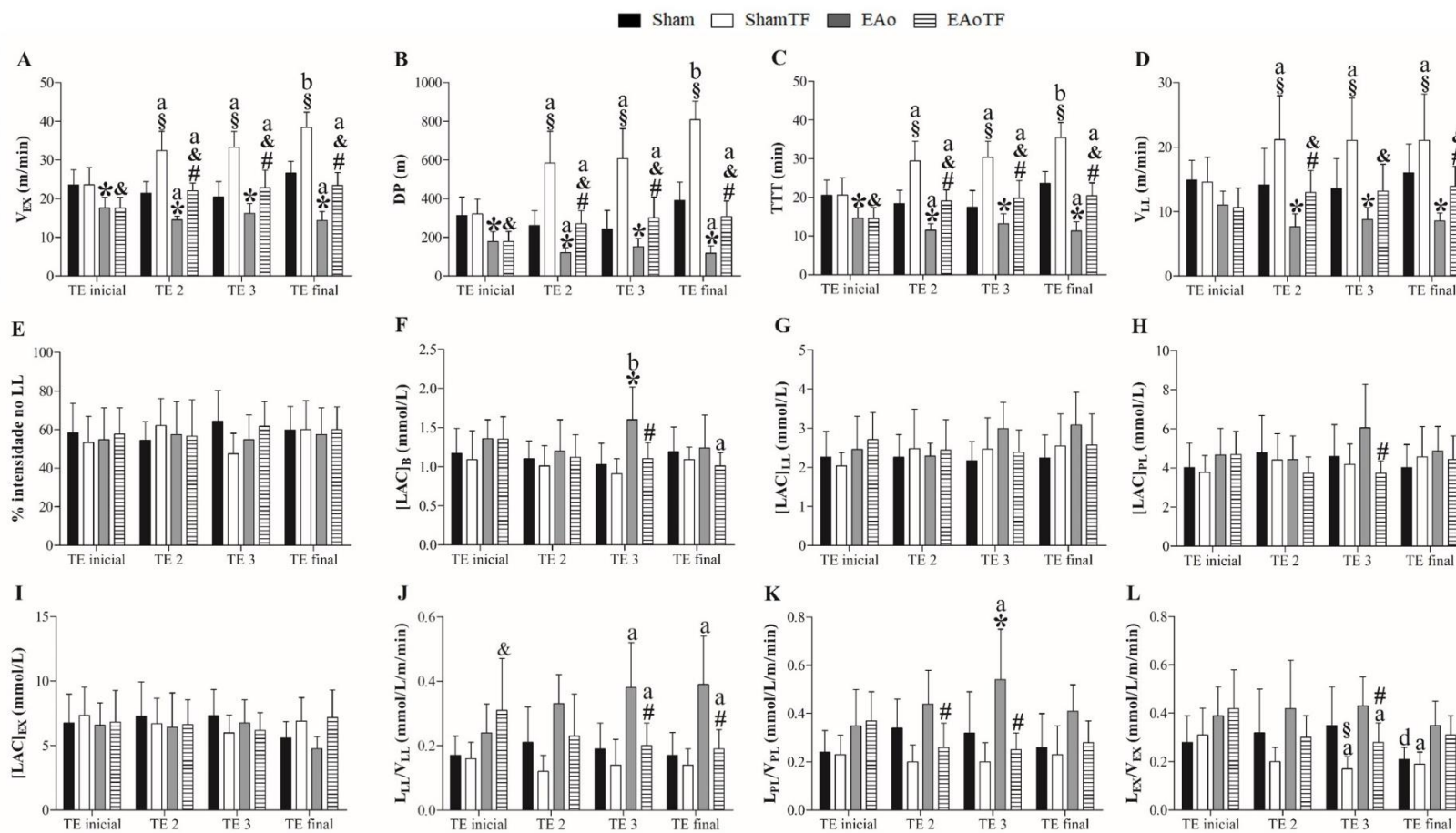


Figura 14. Avaliação do condicionamento físico. Sham: animais submetidos à cirurgia simulada (n= 21); ShamTF: animais submetidos à cirurgia simulada e ao protocolo de treinamento físico (n= 20); EAO: animais submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar (n= 12); EAO TF: submetidos à cirurgia de indução à estenose aórtica supravalvar e ao protocolo de treinamento físico (n= 20). V_{EX} : velocidade de exaustão; DP: distância percorrida; TTT: tempo total de teste; V_{LL} : velocidade do limiar de lactato; $[LAC]_B$: concentração de lactato basal; $[LAC]_{LL}$: concentração de lactato no limiar; $[LAC]_{PL}$: concentração de lactato no pós-limiar; $[LAC]_{EX}$: concentração de lactato na exaustão; L_{LL}/V_{LL} : concentração de lactato no limiar corrigida pela velocidade no ponto; L_{PL}/V_{PL} : concentração de lactato no pós-limiar corrigida pela velocidade no ponto; L_{EX}/V_{EX} : concentração de lactato na exaustão corrigida pela velocidade no ponto. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ EAO vs Sham; # $p < 0,05$ EAO TF vs EAO; & $p < 0,05$ EAO TF vs ShamTF; § $p < 0,05$ ShamTF vs Sham; a \neq TE inicial; b \neq TE inicial e TE 2; c \neq TE inicial, TE2 e TE 3; d \neq TE 2 e TE 3.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O objetivo do trabalho foi analisar a participação do trânsito de cálcio e suas proteínas reguladoras na melhoria da função cardíaca de ratos com estenose aórtica supralvar e disfunção ventricular submetidos a treinamento físico aeróbio. Os dados do ecocardiograma, dos ensaios do músculo papilar, do cardiomiócito e do Western Blot confirmaram a hipótese de que a atenuação da disfunção cardíaca é acompanhada por adequações positivas no trânsito de cálcio miocárdico.

Os resultados do primeiro exame ecocardiográfico, após 18 semanas de indução à estenose aórtica (Tabela 3), mostraram alterações estruturais e disfunção ventricular, diastólica e sistólica, similares aos estudos anteriores (28–33,148). Os valores aumentados da Esp.rel.VE, do IMVE, do AE e do AE/AO no grupo EAo em relação ao Sham, apontam que os animais cardiopatas desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda do tipo concêntrica e dilatação do átrio esquerdo, características marcantes neste modelo experimental de sobrecarga pressórica cardíaca (26,27,29–32,148,149). Baseado na lei de Laplace ($\text{Estresse} = \text{Pressão} \times \text{Raio} / 2 \times \text{Espessura}$), o aumento da Esp.rel.VE teve a finalidade de normalizar o estresse parietal sistólico decorrente da obstrução mecânica da aorta (5,149,150). Entretanto, a queda da função sistólica, identificada pelas variáveis FE, % Enc. Meso e VEPP, sugere que mesmo após o processo hipertrófico, provavelmente, ter normalizado o estresse parietal sistólico, a diminuição da capacidade contrátil foi responsável pela depressão do desempenho sistólico. A dilatação do AE, verificada nestes animais, pode ser consequência do aumento do volume sanguíneo residual decorrente do déficit ejetivo e, principalmente, da disfunção diastólica presente em cardiopatias com sobrecarga pressórica (149,151), evidenciada pelas alterações nas variáveis TDE, ondas E e A' e razões E/A, E/E' e E'/A', as quais supõem aumento da rigidez e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Além disso, é importante destacar que, neste período, os animais EAo apresentaram intolerância ao esforço (Figura 13) em relação aos Sham, indicando que o

déficit funcional cardíaco desencadeou prejuízos periféricos relevantes, panorama característico de insuficiência cardíaca.

A característica fisiológica/adaptativa ou patológica/*maladaptativa* do processo hipertrófico, depende da natureza do estímulo em nível celular, da cascata de sinalização desencadeada e do tempo de exposição ao estresse cardíaco (5). Como referido na seção Introdução, o déficit de oxigênio pela rarefação capilar, a acentuação das ativações dos sistemas adrenérgico e renina-angiotensina-aldosterona e da liberação de mediadores inflamatórios, o estresse oxidativo e a desregulação da expressão gênica miocárdica via microRNA's são considerados indutores cruciais da progressão patológica de estrutura e função do coração (3,4,10,11). Sendo assim, as seguintes respostas fisiopatológicas podem ter sido desencadeadas ao longo das 18 semanas de EAo, e deprimido a capacidade contrátil e de relaxamento dos animais cardiopatas: modificações na matriz extracelular, diminuição da responsividade adrenérgica, alterações das proteínas contráteis, do citoesqueleto e do metabolismo energético, perda de miócitos por necrose, apoptose ou autofagia, reprogramação fetal e prejuízos no processo de acoplamento excitação/contração/relaxamento (3–5,10,11,149–153).

Ao final das 28 semanas de protocolo experimental foram avaliados de forma mais profunda a estrutura e a função cardíaca (ecocardiograma, músculo papilar e cardiomiócito) e, especificamente, o trânsito de Ca^{2+} intracelular (cardiomiócito) e suas proteínas regulatórias (Western Blot).

Em concordância com estudos anteriores (28–33,148), após 28 semanas de cirurgia, os animais com estenose aórtica sedentários (EAo) apresentaram acentuada remodelação cardíaca em relação ao grupo Sham, evidenciada pelos dados do segundo exame ecocardiográfico, o qual mostrou aumento do DDVE, da Esp.rel.VE, do IMVE, do AE e do AE/AO, e pela análise macroscópica *post mortem*, a partir da elevação dos pesos do coração, do VE, do VD e do AT e suas respectivas correções pela tibia. Estes resultados mostram que os ratos cardiopatas

mantiveram hipertrofia do tipo, predominantemente, concêntrica e aumento do diâmetro atrial em relação aos Sham. O início do processo de dilatação do VE objetiva restaurar o equilíbrio hemodinâmico, isto é, diminuir a pressão na câmara cardíaca no final da diástole, a qual pode estar aumentada nas cardiopatias por sobrecarga pressórica; porém, este evento marca o agravamento do processo de remodelação patológica e tem relação direta com a progressiva diminuição da capacidade de ejeção do ventrículo esquerdo na IC (3,11), sinalizada pela diminuição da FE, do VEPP e do % Enc. Meso. Além disso, similar ao observado no estudo de 18 semanas de EAo, os animais cardiopatas apresentaram disfunção diastólica grave, manifestada por alterações no TDE, nas ondas E, E' e A' e nas razões E/A, E/E' e E'/A'. A depressão da função cardíaca foi acompanhada pelo aparecimento de sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca, incluindo: diminuição significativa do peso corporal e intolerância ao esforço, características na caquexia (148), aumento do teor de água no VD, alteração do padrão respiratório, ascite, derrame pleural, trombo atrial e congestão hepática. O agravamento da disfunção cardíaca é decorrente da intensificação dos mecanismos fisiopatológicos discutidos anteriormente (3–5,10,11,149–153), dentre os quais, está incluído o processo de acoplamento excitação/contração/relaxamento.

Neste contexto, as técnicas experimentais, músculo papilar, cardiomiócito e Western Blot, foram realizadas para avaliar o desempenho cardíaco *in vitro* e elucidar a participação da dinâmica do Ca^{2+} e suas proteínas reguladoras na disfunção cardíaca pela EAo. A função mecânica dos músculos papilares e dos cardiomiócitos dos ratos EAo reproduziu o comportamento funcional averiguado no exame ecocardiográfico; estes animais apresentaram rigidez miocárdica (\uparrow TR) e lentificação e diminuição das capacidades de desenvolver força (\downarrow +dT/dt e TD e \uparrow TPT), encurtar (\downarrow FEnc, VME e \uparrow T_{ENC50%}) e relaxar (\downarrow VMR e \uparrow T_{REL50%}). Estes danos funcionais do músculo papilar isolado em fase tardia da estenose aórtica estão alinhados com estudos anteriores do grupo, os quais analisaram a cardiopatia após 6 semanas de cirurgia

(49) e com protocolo experimental similar a esta pesquisa (33). Além disso, em concordância com os resultados do cardiomiócito isolado, a literatura mostra que há diminuição da fração e da velocidade de encurtamento (48).

Como exposto anteriormente, o desajuste do Ca^{2+} citosólico nos cardiomiócitos é um dos mecanismos determinantes para o mal funcionamento cardíaco em resposta a diversos tipos de agressão (3,149,154). Pesquisadores verificaram, em modelos de insuficiência cardíaca, incluindo a estenose aórtica experimental, alterações na expressão e/ou função das proteínas intracelulares e transmembranas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} (36,39–61). No presente estudo, o aumento da expressão proteica da SERCA2a e do NCX pode ter sido um processo adaptativo no intuito de diminuir ou evitar a sobrecarga de Ca^{2+} citosólico no final da diástole. A referida resposta foi, parcialmente, eficiente, desde que mesmo não ocorrendo alterações do Ca^{2+} diastólico, na análise do cardiomiócito, constatou-se lentificação do tempo para atingir 50% do decaimento de Ca^{2+} ($\text{TADC}_{50\%}$); esta adaptação negativa pode ter tido papel preponderante na diminuição da velocidade máxima de relaxamento (VMR) e no aumento do tempo de 50% do relaxamento ($\text{TREL}_{50\%}$) nos cardiomiócitos dos animais sedentários com estenose aórtica. A literatura mostra que na insuficiência cardíaca há aumento da expressão proteica do NCX (48,155), entretanto, diverge quanto aos achados da SERCA2a, a qual, geralmente, está inalterada ou diminuída neste cenário patológico (48,155,156). É importante salientar que a lenta recaptura de Ca^{2+} , averiguada nos animais EAo, pode diminuir a concentração deste íon no RS por intervalo de tempo e, conseqüentemente, a quantidade disponível para liberação (154,155), via RyR, durante a sístole, no mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} proveniente dos canais L; esta pode ser a explicação para o aumento da expressão proteica da RyR no grupo EAo em relação ao Sham, no intuito de potencializar a liberação de Ca^{2+} e manter a homeostase também do Ca^{2+} sistólico. Entretanto, este parece ter sido outro processo adaptativo ineficiente, desde que os animais EAo apresentaram lentificação do tempo para

atingir o pico de Ca^{2+} (TAPC) e consequente aumento do tempo para atingir 50% do encurtamento ($T_{REL50\%}$) e prejuízos sobre a velocidade máxima (VME) e a fração de encurtamento (FEnc). Em concordância com estes achados, Hiemstra *et al* (48) averiguaram deterioração funcional contrátil dos cardiomiócitos e aumento da expressão proteica da RyR em porcos com EAo e fração de ejeção preservada. Entretanto, outros estudos mostram que, embora a referida proteína não apresente modificações de expressão proteica (62,154,157), sofre alterações pós-traducionais complexas, incluindo, nitrosilação (154), oxidação (154) e hiperfosforilação (62,154,157), associadas ao processo arritmogênico na insuficiência cardíaca. Convergindo com a discussão acima, Szymanska *et al* (40) propuseram que, na insuficiência cardíaca pela estenose aórtica, há modificações tanto na captura quanto na liberação de Ca^{2+} pelo RS, e que estes fatores podem contribuir para deteriorar os processos de contração e relaxamento cardíaco.

Com a finalidade de melhor compreender a função da SERCA2a e dos canais L na cardiopatia, foram realizadas quatro manobras inotrópicas e lusitrópicas, durante o ensaio do músculo papilar isolado (potenciação pós-pausa, bloqueio da SERCA2a, elevação de Ca^{2+} extracelular e bloqueio dos canais L).

A potenciação pós-pausa avalia o potencial de recaptura de Ca^{2+} via SERCA2a. Nesta manobra, os animais EAo apresentaram desempenho prejudicado em relação aos Sham e não responderam aos tempos de pausa do estímulo elétrico para as variáveis TD, $+dT/dt$ e $-dT/dt$. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que apontam a estenose aórtica como indutora da deterioração da função da SERCA2a (40,49,61). Nossos achados apontam que o aumento da expressão da SERCA2a, principal agente mantenedor da homeostase do Ca^{2+} citosólico, não foi suficiente para compensar a possível queda da atividade intrínseca destas proteínas na recaptura de Ca^{2+} ; esta hipótese é reforçada pelos resultados deste trabalho, os quais mostraram alteração do TADC_{50%} no cardiomiócito isolado e manutenção da relação entre

SERCA2a/PLB. Estudo anterior do grupo (158) mostrou que os animais EAo, após 2 semanas de cirurgia, apresentam aumento do fator induzível de hipóxia (HIF-1 α), o mais importante sinalizador de déficit de oxigênio tecidual, o que poderia indicar redução da produção energética, isto é, da adenosina trifosfato (ATP); em virtude da SERCA2a ser uma ATPase, em condições de baixa quantidade de ATP, a atividade intrínseca desta proteína poderia estar prejudicada, acarretando desordem no processo de recaptura de Ca²⁺ pelo RS (159). O desfecho citado pode ter sido o fator determinante para o aumento da expressão do NCX, com a finalidade de evitar a sobrecarga diastólica de Ca²⁺ no citosol (48,154). Entretanto, a potencialização da retirada do Ca²⁺ para o meio extracelular, via NCX, poderia diminuir a concentração do Ca²⁺ sistólico e comprometer os encurtamentos posteriores (48); este fenômeno pode ocorrer em virtude da menor recaptura pelo RS acarretar queda do depósito de Ca²⁺ e, conseqüentemente, menor liberação via RyR do retículo sarcoplasmático (154), como mencionado acima.

Além disso, a atividade da SERCA2a foi avaliada em estudo composto pelo bloqueio da referida proteína, via ácido ciclopiazônico (ACP), acompanhado da elevação de Ca²⁺ extracelular. O ACP diminui a afinidade da ATP ao domínio de ligação de nucleotídeo da SERCA2a, o que compromete a capacidade ATPásica desta proteína (160,161). Esta análise da atividade da SERCA2a não expressou diferença de resposta entre os grupos experimentais, para todas as concentrações de Ca²⁺ estudadas. Os achados divergem de Silveira *et al* (49), que após 6 semanas de EAo e a utilização do fármaco, explicitaram diminuição da resposta nos animais cardiopatas, propondo a partir da manobra que os mesmos apresentavam diminuição da atividade da SERCA2a. Entretanto, os referidos pesquisadores não encontraram diferença estatística na quantidade desta proteína entre os animais EAo e Sham (49). Os resultados de Silveira *et al* (49) estão de acordo com outros estudos, os quais mostraram que a estenose aórtica acarreta alterações na função de recaptura de Ca²⁺ pela SERCA2a (40,61).

Como notado, houve diferença de resposta entre as duas manobras (PPP e ACP) para análise da função da SERCA2a. A potenciação pós-pausa mostrou que a atividade da SERCA2a está deteriorada após 28 semanas de estenose aórtica. Entretanto, na análise após bloqueio da SERCA2a pelo ACP, os grupos Sham e EAo apresentaram respostas similares para as variáveis estudadas. Levando em consideração que o grupo cardiopata apresentou maior expressão da referida proteína, o percentual de bloqueio deve ter sido maior no grupo Sham, em virtude de apresentar menor número de SERCA2a que o grupo EAo; porém, como o número de proteínas não bloqueadas do grupo EAo foi maior que do grupo Sham, é possível inferir que esse conjunto de SERCA2a dos animais EAo apresentava prejuízo funcional, devido à similaridade de resposta dos dois grupos durante a manobra com o bloqueador.

A elevação de Ca^{2+} extracelular também foi realizada para analisar o transporte de Ca^{2+} , porém, do meio extracelular para o intracelular, principalmente, pelos canais L e, em menor magnitude, pelo NCX; neste cenário, mesmo que o grupo EAo respondeu inotropicamente às mudanças de concentração, apresentou pior desempenho comparado ao Sham nas concentrações de 1,0 a 3,5 mM para as variáveis TD e $+dT/dt$, o que supõe que os animais cardiopatas tinham função diminuída dos canais L (52,53). O bloqueio dos referidos canais pelo diltiazem confirmou a deterioração da capacidade de transporte de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular do grupo EAo quando comparado ao Sham, como averiguado na manobra anterior. Como citado anteriormente, os níveis de RyR estão aumentados nos animais estenose aórtica sedentários, o que reforça a possibilidade de prejuízo dos canais L. Neste contexto, o aumento do tempo para atingir o pico de Ca^{2+} , detectado pela técnica do cardiomiócito isolado, pode ser produto da lentificação do transporte de Ca^{2+} pelos canais L, o que pode ter promovido menor sinalização para liberação de Ca^{2+} pela RyR no grupo EAo; cenário que pode explicar a redução da FEnc, da VME e aumento do $T_{ENC50\%}$ nos animais cardiopatas. Estes achados estão de acordo com o corpo de evidências da literatura, o qual mostra que a agressão pela EAo gera

uma variante de splicing fetal ($Ca_v1.2_{e21+22}$) que reduz expressão e atividade destes canais e, conseqüentemente, a corrente de Ca^{2+} do meio extra para o intracelular (I_{Ca}), além de aumentar a ubiquitinação dos canais L via degradação proteossomal (52). Além disso, na remodelação patológica pela EAo, somada à diminuição da I_{Ca} , ocorre ineficiência do acoplamento dos canais L com os receptores de RyR, tanto pela degradação dos túbulos T quanto pela diminuição da juntofilina, proteína responsável pela ancoragem do retículo sarcoplasmático à membrana celular (53).

Em virtude da complexidade do processo fisiopatológico da doença, o tratamento da IC tem sido um dos grandes desafios da comunidade científica nas últimas décadas, sendo que o sucesso terapêutico e/ou o prognóstico positivo dependem do tipo, do tempo e da intensidade da agressão, além das características do indivíduo (11,162,163). Dentro deste contexto, diversos fármacos têm sido testados em pesquisas e utilizados na terapêutica do desequilíbrio hemodinâmico, característico da IC (149), dentre os quais podemos citar: 1) diuréticos, com a finalidade de reverter a retenção de fluidos pelos rins e evitar edemas periféricos; 2) vasodilatadores, que contrapõem a vasoconstrição arteriolar, atenuando a deficiência funcional cardíaca; 3) β -bloqueadores, os quais acarretam diminuição da atividade contrátil e poupam energia do músculo cardíaco; e 4) digitálicos, que aumentam o inotropismo miocárdico (149). Entretanto, além dos medicamentos, a prática de atividade física estruturada, referenciada treinamento físico, tem apresentado potencial para atenuar e/ou reverter o processo de transição da hipertrofia patológica à IC (4,5,164). Neste sentido, posteriormente a inúmeras pesquisas e intervenções, tanto no contexto preventivo ou de tratamento complementar às cardiopatias, o **treinamento físico aeróbio (TFa)** emergiu e foi consolidado como ferramenta terapêutica no manejo das doenças cardiovasculares (4,73,77,79–83,86,94).

A proposta deste trabalho foi implementar o TFa após o estabelecimento da disfunção ventricular nos animais com 18 semanas de EAo, panorama observado em estudos anteriores

(28–33,148). O treinamento teve as seguintes características: baixo volume e moderada intensidade; a natureza do protocolo se justifica pela baixa resistência dos animais com sobrecarga pressórica grave ao esforço físico (28–33,148). Este fato foi confirmado no primeiro teste de esforço, após 18 semanas de cirurgia, no qual os animais cardiopatas mostraram intolerância ao exercício, visualizada pela velocidade de exaustão, distância percorrida e tempo do teste, em relação aos respectivos grupos controle.

O exame ecocardiográfico, após 10 semanas de TFa, não detectou efeitos significativos da terapêutica sobre a morfologia cardíaca dos animais cardiopatas, porém, a análise da macroscopia *post mortem* expôs que a prática regular de exercício físico acarretou menor hipertrofia cardíaca, pela diminuição do coração total, do VD e do AT e suas respectivas correções pela tibia em comparação aos sedentários, sem alterações no VE; desfecho semelhante ao observado em estudos anteriores do grupo (29–31). As características intrínsecas dos tipos de hipertrofia do coração pelo exercício ou por agressões nocivas divergem quanto aos aspectos molecular, celular e tecidual (4,5,94,95,164); enquanto no curso patológico há potente processo hipertrófico mediado, principalmente, por angotensina II, endotelina I e norepinefrina, caracterizado por desorganização estrutural e queda da função cardíaca (4,5,11,155), em resposta ao exercício físico crônico ocorre ativação de vias de sinalização que asseguram a hipertrofia fisiológica (insulina, fator de crescimento semelhante à insulina [IGF-1], hormônio tireoidiano [T3], óxido nítrico, fator de crescimento do endotélio vascular [VEGF], neurorregulina 1, integrinas e microRNA's), de menor magnitude, porém, caracterizada pelo crescimento harmônico dos componentes do músculo cardíaco e manutenção ou aumento de função (4,5,94,95,164). Desta forma, os animais EAoTF podem ter apresentado menor nível hipertrófico em virtude do aumento dos fatores que estimulam o crescimento sadio do coração; este cenário pode ter diminuído a importância da hipertrofia por elementos nocivos, a qual acarreta deterioração estrutural e resposta adaptativa funcional prejudicada. A manutenção da

morfologia do VE pode ser explicada pelo estresse parietal sustentado e intenso que, por estímulos mecânico e bioquímico, acarreta hipertrofia *maladaptativa*, a qual poderia superar a resposta hipertrófica fisiológica adaptativa pelo TF. Entretanto, mesmo com a similaridade da hipertrofia do VE entre os grupos cardiopatas, para inferir se houve diminuição do predomínio da via hipertrófica patológica no grupo EAoTF, foi realizada a avaliação funcional do coração.

Neste estudo, como em pesquisas anteriores com protocolos experimentais similares, o exame ecocardiográfico mostrou que o TFa atenuou a disfunção sistólica e, principalmente, o prejuízo diastólico consequente à sobrecarga de pressão imposta pela estenose aórtica (28–33). Os ratos cardiopatas treinados apresentaram maiores valores de VEPP, TDE e A' e menores valores das razões E/A e E'/A' em relação ao grupo sedentário; estes desfechos apontam aumento da capacidade contrátil e menor rigidez miocárdica dos animais EAoTF. Na literatura, em modelos de infarto do miocárdio em ratos (100,120,121,123), de hiperatividade simpática genética em camundongos (70,122) e de sobrecarga de frequência cardíaca por marcapasso ventricular em cães (117), houve prevenção da falência cardíaca pelo TFa; os autores relacionaram os benefícios à melhoria do trânsito de Ca^{2+} e seus agentes regulatórios. Garcarena *et al* (116), em SHR, atribuíram a melhoria funcional cardíaca pelo TF ao aumento da densidade capilar, à diminuição da sinalização pró-apoptótica e à normalização da fibrose intersticial. Em consonância, camundongos com 1 semana de estenose aórtica, submetidos a 9 semanas TF moderado, também apresentaram diminuição da área de fibrose no miocárdio (165); quanto à melhoria da função sistólica, os autores propuseram que, neste modelo experimental, está relacionada à redução do estresse oxidativo e ao aumento da produção de NO pela sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS), ambos associados à ativação do receptor β -3 adrenérgico (165). Entretanto, outras pesquisas em camundongos com estenose aórtica, averiguaram agravamento da disfunção ventricular associado a alterações nas proteínas regulatórias do trânsito de Ca^{2+} (50) e ao aumento da deposição de colágeno (50,166) e do estresse oxidativo

(166), após 8 semanas de exercício voluntário, iniciado imediatamente após a cirurgia; os autores propuseram que a estenose aórtica impede o efeito benéfico vasodilatador do TFa, via ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), em razão da obstrução fixa da aorta (166). Nesta linha, é possível que a atenuação do prejuízo morfofuncional cardíaco pelo TFa seja mais evidente quando o agente agressor sofre influência da terapêutica, por exemplo, na hipertensão arterial sistêmica (88,93,116). Porém, em nosso estudo, mesmo sem modificar o agente agressor (obstrução aórtica), pudemos detectar importantes benefícios funcionais, sistólico e diastólico, pela análise ecocardiográfica; neste sentido, podemos inferir que as adaptações positivas são produtos da melhoria intrínseca das células e dos constituintes do tecido cardíaco.

Em adição às respostas benéficas funcionais no perfil cardiológico dos animais cardiopatas treinados, é possível inferir que ocorreram adequações periféricas importantes pela avaliação dos sinais de insuficiência cardíaca; os ratos EAoTF apresentaram melhor tolerância ao esforço e menores frequência e intensidade de derrame pleural, ascite, alteração do padrão respiratório, congestão hepática, trombo atrial e retenção hídrica no VD em relação aos EAo. Como exposto acima, o grupo EAoTF apresentou atenuação, principalmente, da disfunção diastólica, o que pode ter acarretado diminuição da hipertensão venocapilar pulmonar e sistêmica, a qual está relacionada a processos congestivos, incluindo derrame pleural, ascite e congestão hepática, no curso da IC (167,168). É possível que os animais cardiopatas treinados tenham desenvolvido maior capacidade de excreção de líquidos, o que pode estar relacionado ao melhor funcionamento renal, em razão da diminuição da congestão venosa e da ativação neuro-hormonal, exacerbadas em animais com IC (169). Além disso, o melhor desempenho funcional, durante os testes de esforço, expressaram a melhoria da qualidade de vida e o ganho de condicionamento físico dos animais EAoTF, o que pode ter tido influência, além dos fatores mencionados, do aumento da capacidade aeróbia musculoesquelética (31,148), constatada pelas

menores concentrações de lactato corrigidas pelas velocidades máxima e submáxima de corrida durante os testes de esforço, em concordância com estudos anteriores (125,126).

Desta forma, no intuito de melhor compreender as adaptações positivas intrínsecas aos cardiomiócitos e ao músculo cardíaco nos animais cardiopatas submetidos ao treinamento físico, foram realizadas as técnicas do cardiomiócito isolado e do músculo papilar e a análise molecular pelo Western Blot, para avaliação do trânsito de Ca^{2+} e seus agentes regulatórios.

Os efeitos do treinamento físico aeróbio sobre os músculos papilares e os cardiomiócitos estão alinhados aos achados do exame ecocardiográfico; estes animais apresentaram diminuição da rigidez miocárdica ($\downarrow\text{TR}$) e incrementos das capacidades de encurtar ($\uparrow\text{FEnc}$, VME e $\downarrow\text{T}_{\text{ENC}50\%}$) e relaxar ($\uparrow\text{VMR}$ e $\downarrow\text{T}_{\text{REL}50\%}$). A melhoria da fração de encurtamento e do tempo de relaxamento nos cardiomiócitos de animais cardiopatas treinados, em relação aos sedentários, foi mostrada em importante estudo com ratas infartadas (123), sendo o principal foco da literatura, atualmente, elucidar os mecanismos molecular, celular e tecidual relacionados a essas adaptações.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação do trânsito de Ca^{2+} na atenuação do prejuízo cardíaco pelo TFa nos animais cardiopatas; este mecanismo é considerado fundamental para a melhoria do desempenho do coração pelo TFa na disfunção e insuficiência cardíaca (48,70,94,100,116–123). Segundo Kim *et al* (162), a restauração dos níveis de expressão proteica próximo ao coração normal dos elementos relacionados ao acoplamento excitação-contração-relaxamento está entre as adaptações positivas às terapêuticas implementadas no curso da IC. Nossos resultados confirmam a proposição, desde que os animais EAoTF apresentaram menor expressão proteica de SERCA2a e NCX em relação aos EAo, sendo estes valores similares aos grupos controle; entretanto, os dados estão em desacordo com a literatura que, majoritariamente, aponta manutenção ou aumento da expressão da SERCA2a pelo TFa, em animais normais, infartados e hipertensos (94,116,123,170). Em

porcos com EAo e fração de ejeção preservada submetidos a TFa, autores observaram aumento da relação SERCA2a/PLB, da PLB fosforilada na serina 16 e do NCX, além da diminuição do Ca^{2+} diastólico, associadas a melhorias funcionais dos cardiomiócitos, em relação aos animais sedentários (48). Entretanto, van Deel *et al* (50) não identificaram melhoria da função cardíaca e adequações positivas no trânsito de cálcio pelo treinamento voluntário em camundongos com EAo; a explicação pode estar relacionada ao modelo e a severidade da estenose aórtica e o momento de implementação e tipo de protocolo de treinamento físico. É importante destacar que, em nosso estudo, a diminuição da SERCA2a, nos animais cardiopatas treinados, foi acompanhada da melhoria da função cardiomiocitária em relação aos EAo; na análise do cardiomiócito isolado, estes ratos expressaram melhores valores para VMR e $T_{REL50\%}$ que os sedentários. Além disso, o grupo EAoTF apresentou melhoria da VME, da FEnc e do $T_{ENC50\%}$, o que pode estar relacionado com a maior sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , proposta pelas razões Ca^{2+} sistólico/FEnc e Ca^{2+} sistólico/VME. Em acordo, estudos anteriores mostraram aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} pelo TFa, em ratos normais (101,104) e infartadas (123).

As manobras realizadas durante o músculo papilar isolado, explanadas anteriormente, forneceram suporte quanto aos efeitos do TFa sobre a atividade da SERCA2a e dos canais L nos animais cardiopatas. Na potenciação pós-pausa e no bloqueio do sítio de ligação do ATP da SERCA2a pelo ácido ciclopiazônico, não houve diferença estatística entre os grupos EAoTF e EAo para todas as variáveis e momentos estudados. Como houve queda significativa da expressão da SERCA2a no RS dos ratos EAoTF em relação aos EAo, a similaridade de resposta sugere melhor função da SERCA2a no grupo EAoTF em relação ao EAo; este grupo deveria ter apresentado melhor desempenho após as pausas do estímulo elétrico e menor percentual de inibição após o ACP, em virtude de apresentar maior quantidade de SERCA2a. Autores mostraram, em ratos normais (107,108) e infartados (123), aumento da atividade da SERCA2a

pelo treinamento com exercício aeróbio intervalado. Como citado anteriormente, a referida proteína é ATPásica, dependendo dos níveis de ATP citosólico para desempenhar suas funções normais (159); neste contexto, o número e funcionamento das mitocôndrias tem papel regulador fundamental (171). A literatura mostra que o TFa leva à melhoria da função mitocondrial, prejudicada nas cardiopatias (97), e à diminuição do estresse oxidativo (93), aumentado em condições patológicas (11); sendo assim, no presente estudo, estes mecanismos podem ter tido relação com a atenuação dos prejuízos funcionais da SERCA2a.

A avaliação da elevação de Ca^{2+} extracelular não expressou efeitos positivos do TFa sobre a função dos canais L dos animais EAoTF em relação aos EAo. Entretanto, quando bloqueados os referidos canais pelo diltiazem, o grupo EAoTF apresentou menores níveis de inibição para a variável $-\text{dT}/\text{dt}$, nas concentrações de 1,0 a 3,5 mM de Ca^{2+} . A literatura diverge quanto aos efeitos do treinamento físico sobre a I_{Ca} , a qual é governada pelos canais L, em ratos normais (108–110,172); enquanto autores mostraram aumento da expressão proteica (108) e plasticidade adaptativa dos canais L (172), outras pesquisas não detectaram efeitos do treinamento sobre a I_{Ca} e a referida proteína (109,110). Não acreditamos que o comportamento da $-\text{dT}/\text{dt}$ tenha relação com a função dos canais L, que seria melhor detectada por alterações na TD e $+\text{dT}/\text{dt}$; é possível que os achados estejam associados a prejuízos da SERCA2a, desde que o desempenho da $-\text{dT}/\text{dt}$ sinaliza o desacoplamento do Ca^{2+} à troponina C, regulada principalmente pela função da SERCA2a. Não encontramos explicação para o melhor desempenho de recaptura de Ca^{+2} em baixas concentrações citosólicas deste íon; porém, é importante ressaltar que a maior parte das adequações positivas pelo TF, observadas neste estudo, parecem ter tido relação com a melhor atividade da SERCA2a, a qual perpassa pela melhoria da capacidade oxidativa e da produção de ATP dos cardiomiócitos doentes.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, podemos concluir que o trânsito de cálcio miocárdico pode ter participação na melhoria da função cardíaca dos animais com estenose aórtica supra-avalvar e disfunção ventricular pelo TFa, visto que as técnicas de análise do desempenho cardíaco *in vitro* mostraram que houve melhoria da capacidade de recaptura de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, conseqüente à adequação positiva da atividade da SERCA2a, e aumento da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . A dinâmica de Ca^{2+} é a última manifestação molecular envolvida no processo contração-relaxamento; neste sentido, é fundamental investigar o(s) mecanismo(s) intermediário(s) às respostas positivas pelo TFa no músculo cardíaco hipertrofiado disfuncional, como as observadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol do Estado São Paulo*. 2000;10:8–16.
2. Lorell BH e Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102(4):470–9.
3. Mann DL. Pathophysiology of Heart Failure. In: Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine. 2012. p. 487–504.
4. Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(1):38-48.
5. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(7):387-407.
6. Manuais de Cardiologia. Insuficiência Cardíaca – Remodelamento Cardíaco. Acessado em: 18 de maio de 2015. Disponível em: www.manuaisdecardiologia.med.br/icc.
7. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128(4):388–400.
8. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol do Estado São Paulo*. 2002;12:371–8.
9. Kaplan NM. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P eds *Heart Disease A textbook of cardiovascular medicine* Philadelphia: Saunders Company. 2001. p. 941–71.
10. Schirone L, Forte M, Palmerio S, Yee D, Nocella C, Angelini F, et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3920195.
11. Diwan A, Hill JA, Force TL. Molecular Basis for Heart Failure. In: *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. 2016. p. 1-27.
12. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi M, et al. Direct effects of colchicine on myocardial function: studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;33(1):60–5.
13. Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(9):1135–44.
14. Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Montenegro MR, Tucci PJF. Temporal evolution of structural and functional parameters of cardiac hypertrophy induced in Wistar rats by abdominal aorta constriction. *Arq Bras Cardiol*. 1986;46(1):9–17.
15. Rossi MA e Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of

- myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Hear J.* 1992;124(3):700–9.
16. Rodrigues MA, Bregagnollo EA, Montenegro MR e Tucci PJ. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int J Cardiol.* 1992;35(2):253–7.
 17. Mendes O de C, Campos DHS de, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(1):62–70.
 18. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation.* 1994;90(3):1410–22.
 19. Mestrinel MA. Avaliação morfológica, bioquímica e funcional do remodelamento cardíaco desencadeado por sobrecarga pressórica em ratos com e sem insuficiência cardíaca congestiva. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2003.
 20. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, et al. O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(4):304–8.
 21. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(3):225–32.
 22. Bregagnollo EA, Zornoff LAM, Okoshi K, Sugizaki M, Mestrinel MA, Padovani CR, et al. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2007;117(1):109–14.
 23. Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supravalvar aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(2):225–33.
 24. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation.* 1995;91(10):2642–54.
 25. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, et al. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension.* 1995;25(2):250–9.
 26. de Tomasi LC, Campos DHS, Sant'Ana PG, Okoshi K, Padovani CR, Murata GM, et al. Pathological hypertrophy and cardiac dysfunction are linked to aberrant endogenous unsaturated fatty acid metabolism. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0193553.

27. Sant'Ana PG, Batah SS, Leão PS, Teodoro WR, de Souza SLB, Ferreira Mota GA, et al. Heart remodeling produced by aortic stenosis promotes cardiomyocyte apoptosis mediated by collagen V imbalance. *Pathophysiology*. 2018. pii: S0928-4680(17)30133-5.
28. Mota GAF. Dissertação de Mestrado. Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca, proliferação de cardiomiócitos e níveis de angiotensina-(1-7) e do receptor Mas miocárdicos em ratos com disfunção ventricular. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2017.
29. Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF, et al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(8):1–17.
30. Souza RWA, Fernandez GJ, Cunha JPQ, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2015;309:H1629–H1641.
31. Souza RWA, Piedade WP, Soares LC, Souza PAT, Aguiar AF, Vechetti-Júnior IJ, et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. *PLoS One*. 2014;9(10):e110020.
32. de Souza PAT, de Souza RWA, Soares LC, Piedade WP, Campos DHS, Carvalho RF, et al. Aerobic training attenuates nicotinic acetylcholine receptor changes in the diaphragm muscle during heart failure. *Histol Histopathol*. 2015;30(7):801–11.
33. Souza SLB. Dissertação de Mestrado. Influência do treinamento físico sobre a função cardíaca e o sistema β -adrenérgico miocárdico em ratos com disfunção ventricular. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2017.
34. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. *The Heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 209-31.
35. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(January):198–415.
36. O'Rourke B. The Ins and Outs of Calcium in Heart Failure. *Circ Res*. 2008;102(11):1301–03.
37. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1-14.
38. Bers DM. Ca influx via sarcolemmal Ca channels. In: Bers DM. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic publishers; 2001. 203-44 p.
39. Bentivegna LA, Ablin LW, Kihara Y, Morgan JP. Altered calcium handling in left ventricular pressure-overload hypertrophy as detected with aequorin in the isolated, perfused ferret heart. *Circ Res*. 1991;69(6):1538–45.
40. Szymanska G, Strömer H, Mim DH, Lorell BH, Morgan JP. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Pflugers Arch*.

2000;439:339–48.

41. Høydal MA, Kirkeby-Garstad I, Karevold A, Wiseth R, Haaverstad R, Wahba A. Human cardiomyocyte calcium handling and transverse tubules in mid-stage of post-myocardial-infarction heart failure. *ESC Heart Fail.* 2018;5(3):332-42.
42. Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL and Morgan JP. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res.* 1991;68(5):1390–400.
43. Mishra S, Sabbah HN, Rastogi S, Imai M, Gupta RC. Reduced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger expression in left ventricle myocardium of dogs with progression of heart failure. *Heart Vessels.* 2005;20(1):23-32.
44. Mukherjee R, Spinale FG. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(10):1899–916.
45. Rossner KL. Calcium current in congestive heart failure of hamster cardiomyopathy. *Am J Physiol.* 1991;260(4 Pt 2):H1179-86.
46. Mørk HK, Sjaastad I, Sejersted OM, Louch WE. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in post infarction mice. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2009;296(4):H1069-79.
47. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. *Circ Res.* 2013;113(6):690–708.
48. Hiemstra JA, Veteto AB, Lambert MD, Olver TD, Ferguson BS, McDonald KS, et al. Chronic low-intensity exercise attenuates cardiomyocyte contractile dysfunction and impaired adrenergic responsiveness in aortic-banded mini-swine. *J Appl Physiol* (1985). 2018;124(4):1034–44.
49. Silveira CFSMP, Campos DHS, Freire PP, Deus AF, Okoshi K, Padovani CR et al. Importance of SERCA2a on early isolated diastolic dysfunction induced by supralvalvular aortic stenosis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2017;50(5):e5742.
50. van Deel ED, de Boer M, Kuster DW, Boontje NM, Holemans P, Sipido KR et al. Exercise training does not improve cardiac function in compensated or decompensated left ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):1017–25.
51. Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sem S, Lakatta EG, Crow MT, et al. Heart failure after long-term supralvalvar aortic constriction in rats. *Am J Hypertens.* 2005;18(2 Pt 1):202–12.
52. Hu Z, Wang JW, Yu D, Soon JL, de Kleijn DP, Foo R, et al. Aberrant Splicing Promotes Proteasomal Degradation of L-type CaV1.2 Calcium Channels by Competitive Binding for CaVβ Subunits in Cardiac Hypertrophy. *Sci Rep.* 2016;6:35247.
53. Xu M, Zhou P, Xu SM, Liu Y, Feng X, Bai SH, et al. Intermolecular failure of L-type

- Ca²⁺ channel and ryanodine receptor signaling in hypertrophy. *PLoS Biol.* 2007;5(2):e21.
54. Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest.* 2013;123(1): 46–52.
 55. Gómez AM, Guatimosim S, Dilly KW, Vassort G, Lederer WJ. Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation.* 2001;104(6):688–93.
 56. Holt E, Tønnessen T, Lunde PK, Semb SO, Wasserstrom JA, Sejersted OM, et al. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(8):1581–93.
 57. Miyamoto MI, Monte F, Schmidt U, Di Salvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(2):793–8.
 58. Wang Z, Nolan B, Kutschke W, Hill JA. Na⁺-Ca²⁺ exchanger remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2001;276(21):17706–11.
 59. Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; 37 : 290-299. 1998;1998.
 60. Aggarwal R, Boyden PA. Diminished Ca²⁺ and Ba²⁺ currents in myocytes surviving in the epicardial border zone of the 5-day infarcted canine heart. *Circ Res.* 1995;77:11180–91.
 61. Schouten VJ, Vliegen HW, van der Laarse A, Huysmans HA. Altered calcium handling at normal contractility in hypertrophied rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(9):987–98.
 62. Respress JL, van Oort RJ, Li N, Rolim N, Dixit S, de Almeida A. Role of RyR2 Phosphorylation at S2814 during Heart Failure Progression. *Circ Res.* 2012;110(11):1474-83.
 63. Moreira VO, Pereira CA, Silva MO, Felisbino SL, Cicogna AC, Okoshi K, et al. Growth hormone attenuates myocardial fibrosis in rats with chronic pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(3):325–30.
 64. Rinne P, Ruohonen ST, Ruohonen S, Savontaus E. Pharmacological treatment with a melanocortin analogue protects against pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *FASEB J.* 2013;27:652–19.
 65. Wong K, Boheler KR, Petrou M, Yacoub MH. Pharmacological modulation of pressure-overload cardiac hypertrophy: changes in ventricular function, extracellular matrix, and gene expression. *Circulation.* 1997;96(7):2239–46.
 66. Xu XH, Xu J, Xue L, Cao HL, Liu X, Chen YJ. VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation. *J Cardiothorac Surg.* 2011;6(54):1–9.

67. Jula AM, Karanko HM. Effects on left ventricular hypertrophy of long-term nonpharmacological treatment with sodium restriction in mild-to-moderate essential hypertension. *Circulation*. 1994;89(3):1023–31.
68. Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA*. 2000;283(23):3095–101.
69. Turner MJ, Spina RJ, Kohrt WM, Ehsani AA. Effect os endurance exercise training on left ventricular size and remodeling in older adults with hypertension. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(4):M245-51.
70. Medeiros A, Rolim NPL, Oliveira RSF, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, et al. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol*. 2008;104:103–9.
71. U.S. Department of Health and Human Services. *Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevent. 1996;
72. Capersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Heal Rep*. 1985;100(2):126–31.
73. Blair SN. Exercício, Envelhecimento Bem-Sucedido e Prevenção das Doenças. In: *Fisiologia do Exercício: Nutrição, Energia e Desempenho Humano*. 2010. p. 854–957.
74. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. 2013;17(2):162–84.
75. *Global Recommendations on Physical Activity for Health*. World Health Organization. 2010. Acessado em: 27 de maio de 2015. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/9789241599979/en/>.
76. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006;174(6):801–9.
77. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*. 2012; 2(2): 1143–211.
78. Leskinen T, Stenholm S, Aalto V, Head J, Kivimäki M, Vahtera J. Physical activity level as a predictor of healthy and chronic disease-free life expectancy between ages 50 and 75. *Age Ageing*. 2018;47(3):423-9.
79. Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther*. 2007;114(3):307–17.
80. Myers J. Exercise and Cardiovascular Health. *Circulation*. 2003;107:e2–5.
81. Pedersen BK, Saltin BK. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as

- therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015;25 Suppl 3:1-72.
82. Fernandes T, Soci UP, Oliveira EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):836–47.
 83. Agarwal SK. Cardiovascular benefits of exercise. *Int J Gen Med*. 2012;5:541-5.
 84. D'Souza A, Bucchi A, Johnsen AB, Logantha SJ, Monfredi O, Yanni J, et al. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat Commun*. 2014;5:3775.
 85. Carneiro-Júnior MA, Prímola-Gomes TN, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, et al. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol*. 2013;115(1):107–15.
 86. Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation*. 2010;122(12):1221–38.
 87. Brum PC, Forjaz CLM, Tinucci T, Negrão CE. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís*. 2004;18:21–31.
 88. Forjaz CL, Tinucci T, Ortega KC, Santaella DF, Milon D Jr, Negrão CE. Factors affecting post-exercise hypotension in normotensive and hypertensive humans. *Blood Press Monit*. 2000;5(5–6):255–62.
 89. Forjaz CL, Ramires PR, Tinucci T, Ortega KC, Salomão HE, Ignês EC, et al. Postexercise responses of muscle sympathetic nerve activity and blood flow to hyperinsulinemia in humans. *J Appl Physiol*. 1999;87(2):824–9.
 90. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakaguchi A, Kawamura M, et al. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens*. 2007;20(8):825–30.
 91. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*. 2003;108(5):530–5.
 92. Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Sasaki N, Matsuura H, et al. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*. 1999;100(11):1194–202.
 93. Silva Jr SD, Jara ZP, Peres R, Lima LS, Scavone C, Montezano AC. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189535.
 94. Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, Patterson NL, McMullen LR. Understanding key

- mechanisms of exercise-induced cardiac protection to mitigate disease: current knowledge and emerging concepts. *Physiol Rev.* 2018;98:419–75.
95. Fernandes T, Barauna VG, Negrao CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2015;12:ajpheart.00899.2014.
 96. Guimarães GG, Santos SH, Oliveira ML, Pimenta-Velloso EP, Motta DF, Martins AS. Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. *Peptides.* 2012;38(1):54-61.
 97. Campos JC, Queliconi BB, Bozi LHM, Bechara LRG, Dourado PMM, Andres AM. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. *Autophagy.* 2017;13(8):1304-17.
 98. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1998;275:R1468–R1477.
 99. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol.* 2001;91:2205–12.
 100. Melo SFS, Barauna VG, Neves VJ, Fernandes T, Lara LS, Mazzotti DR, et al. Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca²⁺ handling after myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:166.
 101. Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res.* 2001;50(3):495–508.
 102. Diffie GM, Seversen EA, Titus MM, Gary M, Seversen EA, Ti- MM. Exercise training increases the Ca²⁺ sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *J Appl Physiol.* 2001;91:309–15.
 103. Locatelli J, De Assis LVM, Isoldi MC. Calcium handling proteins: Structure, function, and modulation by exercise. *Heart Fail Rev.* 2014;19(2):207–25.
 104. Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisløff U, et al. Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):161–72.
 105. Kemi OJ, Wisløff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol.* 2010;199(4):425–39.
 106. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G WU. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(3):354–61.
 107. Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL, Wisloff U. Myocardial sarcoplasmatic

- reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15(2):145–8.
108. Morán M, Saborido A, Megías A. Ca²⁺ regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training. *Pflugers Arch.* 2003;446(2):161–8.
 109. Mokolke EA, Palmer BM, Cheung JY, Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1997;42(3):H1193–7.
 110. Delgado J, Saborido A, Morán M, Megías A. Chronic and acute exercise do not alter Ca²⁺ regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. *J Appl Physiol.* 1999;87(1):152–6.
 111. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008;214(2):316–21.
 112. de Andrade LH, de Moraes WM, Matsuo Junior EH, de Orleans Carvalho de Moura E, Antunes HK, Montemor J, et al. Aerobic exercise training improves oxidative stress and ubiquitin proteasome system activity in heart of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2015;402(1–2):193–202.
 113. Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, Antônio EL, Levy RF, Santos AA, et al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol.* 2010;588(Pt 13):2431–42.
 114. Serra AJ, Higuchi ML, Ilhara SS, Antônio EL, Santos MH, Bombig MT, et al. Exercise training prevents beta-adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions. *Eur J Hear Fail.* 2008;10(6):534–9.
 115. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation.* 2007;115(24):3086–94.
 116. Garcarena CD, Pinilla AO, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension.* 2009;53(4):708–14.
 117. Lu L, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, et al. Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. *J Appl Physiol.* 2002;92(4):1524–30.
 118. Høydal MA, Stølen TO, Kettlewell S, Maier LS, Brown JH, Sowa T, et al. Exercise training reverses myocardial dysfunction induced by CaMKII overexpression by restoring Ca²⁺ homeostasis. *J Appl Physiol.* 2016;121:212–20.
 119. Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Amadeu MA, et al. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.*

2014;0:0.

120. Kemi OJ, MacQuaide N, Hoydal MA, Ellingsen O, Smith GL WU. Exercise training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats. *J Cell Physiol.* 2012;227(1):20–6.
121. Bito V, de Waard MC, Biesmans L, Lenaerts I, Ozdemir S, van Deel E et al. Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodeling or hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2010;86(1):72–81.
122. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007;29(3):246–52.
123. Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL EØ. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2a in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;54(1):162–74.
124. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V, Irigoyen M-C, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2007;6(1):38.
125. Brito Vieira WH, Halsberghe MJ, Schwantes ML, Perez SE, Baldissera V, Prestes J, Farias DL PN. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz J Biol.* 2014;74(2):444–9.
126. Ghosh A. Anaerobic threshold: its concept and role in endurance sport. *Malays J Med Sci.* 2004;11(1):24–36.
127. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebakk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000 Oct;89(4):1445–54.
128. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Oct;279(4):H1534–9.
129. Ono K, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Sakata Y, Nishikawa N, et al. Echo doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):109–17.
130. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* 1996;94(5):1109–17.
131. Cantor EJF, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 May;38(5):777–86.
132. de Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J*

- Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284(6):H2242-6.
133. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci.* 2000;320(4):244–8.
 134. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DHS, Luvizotto R de AM, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol.* 2011;226(11):2934–42.
 135. Riou B, Lecarpentier Y, Viars P. Inotropic effect of ketamine on rat cardiac papillary muscle. *Anesthesiology.* 1989;71(1):116–25.
 136. Urthaler F, Walker AA, Reeves DN HL. Maximal twitch tension in intact length-clamped ferret papillary muscles evoked by modified postextrasystolic potentiation. *Circ Res.* 1988;62(1):65–74.
 137. Yamato T, Yamasaki S, Misumi Y, Kino M, Obata T AM. Postrest contraction in the ventricular papillary muscle of spontaneously diabetic MBN/Kob rat. *Exp Anim.* 2001;50(1):19–31.
 138. David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, Coriat P RB. Interaction of potamine with alpha- and beta-adrenoreceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology.* 2002;96(2):521.
 139. Yamazaki M, Kamitani K, Ito Y MY. Effects of halothane and diltiazem on L-type calcium currents in single smooth muscle cells from rabbit portal veins. *Br J Anaesth.* 1994;73(2):209–13.
 140. Hockerman GH, Dilmac N, Scheuer T CW. Molecular determinants of diltiazem block in domains III S6 and IV S6 of L-type Ca(2+) channels. *Mol Pharmacol.* 2000;58(6):1264–70.
 141. Schwinger RH, Brixius K, Bavendiek U, Hoischen S, Müller-Ehmsen J, Bölcck B et al. Effect of cyclopiazonic acid on the force-frequency relationship in human nonfailing myocardium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(1):286–92.
 142. du Toit EF OL. Inhibitors of Ca²⁺ ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;24(4):678–84.
 143. Guatimosim S, Sobie EA, Dos Santos Cruz J, Martin LA LW. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2001;280(5):1327–39.
 144. Nowakowski A, Andrzejewska A, Janowski M, Walczak P LB. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp.* 2013;73(1):1–18.
 145. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007;29(3):246-52.
 146. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca²⁺

- channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(6):426-31.
147. Johnson RA and Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 6th ed. New Jersey; 2007. 773 p.
 148. Gomes MJ, Martinez PF, Campos DH, Pagan LU, Bonomo C, Lima AR, et al. Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8695716.
 149. Katz AM. Heart Failure. In: *Physiology of the Heart*. 2011. p. 510-47.
 150. Plitt GD, Spring JT, Moulton MJ, Agrawal DK. Mechanisms, diagnosis, and treatment of heart failure with preserved ejection fraction and diastolic dysfunction. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2018;16(8):579-89.
 151. van Heerebeek L, Paulus WJ. Alterations in Ventricular Function: Diastolic Heart Failure. In: *Heart Failure: A companion to Braunwald's Heart Disease*. 2016. p. 156-76.
 152. Gu J, Zhao F, Wang Y, Gao J, Wang X, Xue J, et al. The Molecular Mechanism of Diastolic Heart Failure. *Integr Med Int*. 2015;2:143-8.
 153. Souders CA, Borg TK, Banerjee I, Baudino TA. Pressure overload induces early morphological changes in the heart. *Am J Pathol*. 2012;181(4):1226-35.
 154. Nabeebaccus A, Sag CA, Webb I, Shah AM. Cellular Basis for Heart Failure. In: *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. 2016. p. 28-41.
 155. Hasenfuss G, Mann DL. Pathophysiology of Heart Failure. In: *Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 2019. p. 442–460.
 156. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res*. 2008 15;77(2):265-73.
 157. van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, Pereira L, Yang Y, Respress JL. Ryanodine Receptor Phosphorylation by CaMKII Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice with Heart Failure. *Circulation*. 2010;122(25):2669-79.
 158. Sant'Ana PG. Tese de Doutorado. Fator induzível por hipóxia miocárdica, metabolismo de glicose, estrutura e função ventricular durante o processo de evolução da remodelação cardíaca: comportamento e associação. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2018;
 159. Katz AM. Excitation-Contraction Coupling: Extracellular and Intracellular Calcium Cycles. In: *Physiology of the Heart*. 2011. p. 143-76.
 160. Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPases of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1989;264(30):17816-23.
 161. Martínez-Azorín F. Cyclopiazonic acid reduces the coupling factor of the Ca²⁺-

- ATPase acting on Ca²⁺ binding. *FEBS Lett.* 2004;576(1-2):73-6.
162. Kim GH, Uriel N, Burkhoff D. Reverse remodeling and myocardial recovery in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(2):83-96.
 163. Wikman-Coffelt J, Parmley WW, Mason DT. The Cardiac Hypertrophy Process. Analyses of Factors Determining Pathological Vs. Physiological Development. *Circ Res.* 1979;45(6):697-707.
 164. Scheuer J, Malhotra A, Hirsch C, Capasso J. Physiologic Cardiac Hypertrophy Corrects Contractile Protein Abnormalities Associated with Pathologic Hypertrophy in Rats. *J Clin Invest.* 1982;70(6):1300-5.
 165. Wang B, Xu M, Li W, Li X, Zheng Q, Niu X. Aerobic exercise training protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via β 3-AR-nNOS-NO activation. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179648.
 166. van Deel ED, Octavia Y, Waard MC, Boer M, Duncker DJ. Exercise training has contrasting effects in myocardial infarction and pressure overload due to divergent endothelial nitric oxide synthase regulation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1-12.
 167. Apostolo A, Giusti G, Gargiulo P, Bussotti M, Agostoni P. Lungs in heart failure. *Pulm Med.* 2012;2012:306207.
 168. Alvarez AM, Mukherjee D. Liver Abnormalities in Cardiac Diseases and Heart Failure. *Int J Angiol.* 2011; 20:135-42.
 169. Polonsky TS, Bakris GL. Alterations in Kidney Function Associated with Heart Failure. In: *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease.* 2016. p. 1-27.
 170. Kemi OJ, Ceci M, Condorelli G, Smith GL WU. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2008;15(2):145-8.
 171. Wang K, Xu Y, Sun Q, Long J, Liu J, Ding J. Mitochondria regulate cardiac contraction through ATP-dependent and independent mechanisms. *Free Radic Res.* 2018;3:1-10.
 172. Wang S, Zheng J, Shu M, Zhu S, Jie D. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Eur J appl Physiol.* 2008;104:549-55.